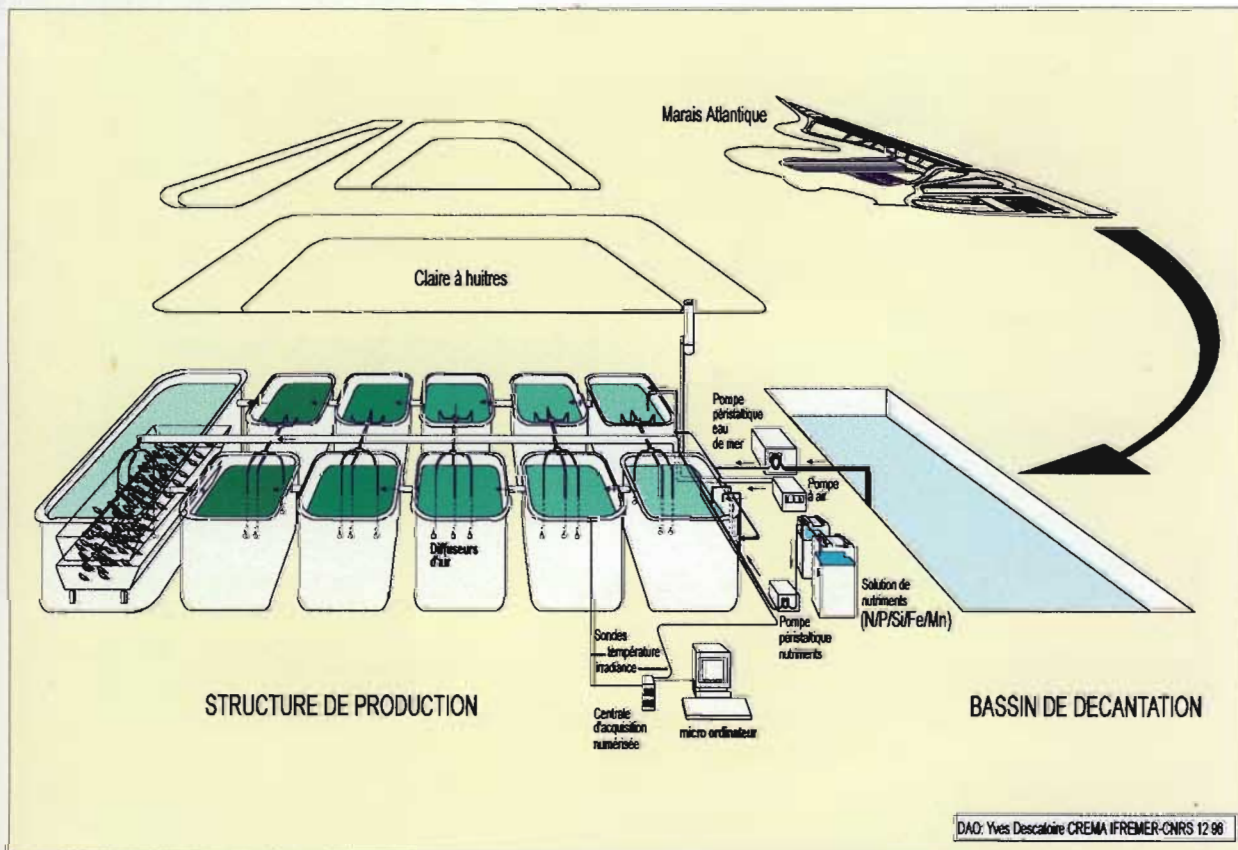


MAITRISE DE LA CULTURE DE MASSE DE LA DIATOMÉE *Skeletonema costatum* EN SYSTEME OUVERT ET CONTINU, SUR UN MILIEU EN "EAU DE MER ENRICHIE"

Nicolas Brossard et Jérôme Hussenot



RI DRV/RA/RST/97-04 CREMA L'Houmeau

140

Type de rapport : Rapports Internes de la Direction des Ressources Vivantes de l'Ifremer	
Numéro d'identification du rapport : DRV/RA/RST/97-04	date de publication : Mars 1997
Diffusion : restreinte	nombre de pages : 37
Validé par :	bibliographie (oui) 41 réf.
Adresse électronique : - chemin UNIX :	illustration(s) : 15
- adresse WWW :	langue du rapport : français
Titre et sous-titre du rapport :	
Maîtrise de la culture de masse de la diatomée <i>Skeletonema costatum</i> en système ouvert et continu, sur un milieu en eau de mer enrichie	
Titre traduit : Mass culture control of the diatom <i>Skeletonema costatum</i> in open and continuous system with an original enriched seawater medium	
Auteur(s) principal(aux) Nicolas BROSSARD Jérôme HUSSENOT	Organisme / Direction / Service, laboratoire IFREMER / DRV RA / CREMA / L'Houmeau
Collaborateur(s) : nom, prénom	Organisme / Direction / Service, laboratoire Cnrs-Ifremer CREMA Equipe Aquaculture-Environnement BP 5 17137 L'Houmeau
Organisme commanditaire : nom développé, sigle, adresse	
Titre du contrat :	n° de contrat Ifremer
Organisme(s) réalisateur(s) : nom(s) développé(s), sigle(s), adresse(s)	
Responsable scientifique :	
Cadre de la recherche :	
Programme : Claire ostréicoles	Convention : Contrat de plan Ifremer/Poitou-Charentes
Projet :	Autres (préciser) :
Campagne océanographique : (nom de campagne, année, nom du navire)	



SOMMAIRE

INTRODUCTION

Résumé :

Une culture extérieure en masse de la diatomée *Skeletonema costatum*, en système ouvert et continu, a été réalisée en automne 1996, au marais expérimental du CREMA l'Houmeau. Le but était d'apporter une nourriture complémentaire aux huîtres en période d'affinage. Le module expérimental se compose de 5 bacs en série, aérés, de volume total 2 m³, et de débit 235 litres.jour⁻¹. Un nettoyage des parois doit être effectué régulièrement, pour éviter le développement d'algues compétitrices de la diatomée fourrage. La consommation des nutriments, au pic de biomasse, est totale et s'effectue dans un rapport atomique N:P:Si de 11:1:5, proche du milieu de culture amendé 10:1:4. La densité cellulaire produite se stabilise à 5.10⁵ cellules par ml, soit 3 fois moins que la production théorique du milieu en conditions printanières. Les cellules sont par contre 3 à 4 fois plus riches en chlorophylle *a* qu'au printemps. Le renouvellement optimal a été déterminé. Il doit être réglé entre 12 et 20% volume.jour⁻¹ selon les conditions climatiques d'automne.

Abstract :

An outdoor mass culture of the diatom *Skeletonema costatum* using a continuous and opened system, was carried out during autumn 1996 at the CREMA L'Houmeau (France). Our objective was to supplement oyster feeding during the refining period. Phytoplankton was produced in a serie of 5 aerated tanks. Total volum was 2 m³ with a 235 L.day⁻¹ dilution rate. Tanks have to be cleaned regularly to avoid the development of competitor to *Skeletonema costatum*. At maximum biomass, nutrient consumption was total in a 11:1:5 ratio (N:P:Si), closed to culture media ratio 10:1:4. Cell density reached 5.10⁵ cells.L⁻¹, i.e. 3-fold less than a theoretical spring production. However, cells contained 3 to 4-fold more chlorophyll *a* than spring ratio. Considering the autumn climate conditions, optimal dilution rates was set at 12-20% vol.day⁻¹.

Mots clés :

Phytoplankton, microalgues, diatomées, *Skeletonema costatum*, culture de masse, culture continue, affinage d'huîtres

Key words :

Phytoplankton, diatoms, *Skeletonema costatum*, mass culture, continuous culture, oyster fattening

Commentaire :

SOMMAIRE

I - INTRODUCTION	3
II - MATERIELS ET METHODES	5
2.1. Structure expérimentale	5
2.2. Milieu nutritif	7
2.3. Gestion et suivi de la culture	9
2.4. Calendrier expérimental	9
III - RESULTATS	11
3.1. Conditions climatiques durant l'expérimentation	11
3.2. Evolution journalière des cultures continues de <i>Skeletonema costatum</i>	11
3.2.1. Qualité physico-chimique	11
3.2.2. Biomasse microalgale par mesures <i>in vivo</i> (absorption à 680 nm et fluorimétrie <i>in vivo</i>)	13
3.3. Recherche du renouvellement optimal de la culture	16
3.3.1. Stabilisation de la culture et taux de croissance journalier	16
3.3.2. Renouvellement optimal en fonction des conditions climatiques	17
3.4. Analyses qualitatives et quantitatives ponctuelles sur les séries A et A'	19
3.4.1. Etat des cultures aux périodes d'observation	19
3.4.2. Espèces phytoplanctoniques	20
3.4.3. Nutriments	21
3.4.4. Biomasse microalgale	22
3.4.4.1. Comptage cellulaire	22
3.4.4.2. Chlorophylle <i>a</i> et pigments totaux	23
3.4.4.3. Corrélation entre les différents paramètres	23
IV - DISCUSSION	26
4.1. La culture	26
4.2. Les indicateurs de la biomasse pour le suivi de la culture	27
4.3. Le renouvellement de la culture et la quantité de cellules produites	28
4.4. Les recherches à poursuivre	28
V - CONCLUSION	29
VI - BIBLIOGRAPHIE	30
ANNEXE 1 : Méthodes d'analyse de la qualité de l'eau	33
ANNEXE 2 : Essai d'engraisement d'huîtres creuses	36

I- INTRODUCTION

La production en masse de microalgues à un faible coût de production, est une préoccupation partagée au niveau international par de nombreux scientifiques, qu'ils soient tournés (i) vers les biotechnologies pour favoriser et extraire certains composés à haute valeur marchande (produits cosmétiques ou médicamenteux), (ii) ou vers la production aquacole qui recherche une optimisation des croissances par des apports nutritionnels aux espèces cultivées (mollusques, poissons, ...).

Les diatomées sont considérées comme un des groupes de microalgues les plus intéressants à favoriser, et s'opposent parfois aux flagellés qui peuplent les eaux colorées toxiques. Favoriser sur des eaux de mer naturelles ces "bonnes algues" (Schöllhorn et Granéli, 1996) est du domaine du possible par de simples modifications des concentrations et des rapports des éléments nutritifs disponibles dans l'eau de mer (Schöllhorn et Granéli, 1996; Hussenot et Gautier, 1994; Hussenot et Brossard, 1995). En France, une technique simple de production de diatomées en masse, utilisant des eaux salées souterraines riches en gaz carbonique, en sels nutritifs et en métaux, notamment en silice et fer, a été développée par la station de recherche Ifremer-Bouin (Baud, 1988), dans le but d'apporter une algue fourrage (*Skeletonema costatum*) aux différentes phases de production de l'huître creuse ou de la palourde (écloserie, nurserie, grossissement, affinage). Une quinzaine d'entreprises privées appliquent ces techniques en Vendée, autour de la Baie de Bourgneuf.

En Charente-Maritime, les eaux salées souterraines sont beaucoup moins abondantes et sont situées souvent à des profondeurs dix fois plus importantes qu'en Vendée (100m au lieu de 10m), augmentant les coûts de forage et les risques d'échec. Pour ces raisons, le CREMA-L'Houmeau qui travaille depuis sa création en 1984, sur la stimulation de la productivité naturelle des marais salés aménagés, a entrepris des travaux de recherche sur la production de masse de diatomées en extérieur (température et lumière naturelle). Un milieu simple et économique a été mis au point (Hussenot *et al.*, 1997) pour réaliser des cultures de masse en grands volumes de *S. costatum* sur eau de mer naturelle. Le fer et le manganèse sont ajoutés aux trois nutriments essentiels (N-P-Si), sans apporter de chélateurs et de vitamines. Nos travaux de recherche, après des essais de culture de type non renouvelée (Gautier *et al.*, 1993, Hussenot et Brossard, 1995), se sont orientés vers les cultures semi-continues (Froissard, 1994). Des travaux très similaires ont été menés indépendamment au Portugal pour évaluer l'effet de la vitesse de la dilution de cultures en grands volumes sur l'orientation de *S. costatum* (Borges, 1986). Aujourd'hui, nos travaux s'orientent vers un système de culture ouverte et continue, système que nous tentons également de développer pour le traitement des effluents de pisciculture marine intensive basée à terre (Lefebvre *et al.*, 1996). Les avantages de ce dernier type de culture sont nombreux :

(i) il permet de tenir en culture des cellules qui seront toujours dans le même état physiologique, les conditions maintenues pouvant favoriser des cellules à haute valeur nutritive comme le taux de protéines (Taub, 1980), les acides gras polyinsaturés (Molina *et al.*, 1994; Parrish et Wangersky, 1990),...

(ii) le lancement de la culture continue est réalisée une seule fois au démarrage de celle-ci. Les travaux laborieux de lancement journalier de bacs de cultures non renouvelées (nettoyage, préparation du milieu, ensemencement,...) se simplifient. La culture se maintient plusieurs semaines ou plusieurs mois en état stable, avec un minimum de surveillance.

(iii) une automatisation de la culture devient possible, comme dans un photobioréacteur (Chaumont, 1993) en pilotant l'arrivée des fluides (eau de mer et enrichissements) en fonction des paramètres climatiques comme la lumière, la température dans les systèmes dits de "chémostat", ou en contrôlant les apports nutritifs en fonction de la densité de la culture mesurée en sortie, par un capteur de turbidité, dans les systèmes dits de "turbidostat".

Les premiers essais de cultures continues ouvertes menés en France, dans une optique conchylicole, ont été effectués par Riva et Lelong (1978) qui ont suivi les espèces phytoplanctoniques dans un bassin en béton de 35m³ recevant une eau de mer enrichie avec simplement deux engrais agricoles azotés et phosphorés, dans un rapport N:P de 16:1 (atome:atome). La variabilité saisonnière était importante et le nannoplancton montrait une nette dominance par rapport aux diatomées et aux dinoflagellés.

Aux USA (Massachussets), une technique intermédiaire entre celle de Baud et celle de Riva et Lelong a été développée dans les années 1980 pour la culture commerciale de *Mercenaria mercenaria* en nurserie (Walsh et al., 1985, 1987). Elle consistait à cultiver en bassins de 40m³, en culture continue, des souches de *Thalassiosira pseudonana* et *Skeletonema menzelii* sur eau salée souterraine, enrichie en macro- et micro-nutriments du milieu "f" de Guillard (Guillard, 1975) aux doses 2f en silicates, et f/2 en nitrate, phosphate et en mélange de métaux traces, sans ajout des vitamines.

Le présent travail consiste à valider une culture extérieure et continue sur eau de mer enrichie, en cherchant à déterminer empiriquement le taux de dilution optimal de la culture aux différentes conditions climatiques automnales (période de l'affinage des huîtres en claires). L'outil expérimental a été spécialement adapté pour nous permettre d'isoler différents volumes, qui traversés par la culture, permettront de créer des temps de séjour plus ou moins longs.

II - MATERIELS ET METHODES

Les expérimentations ont été conduites en extérieur sur le marais expérimental du CREMA de fin octobre 1996 à fin décembre 1996 correspondant à la période automnale de l'affinage d'huîtres en claires, en marais charentais.

Le principe de la culture en continu

La culture continue de microalgues est une culture à volume constant, renouvelée par un débit régulier, intrant d'eau de mer et de nutriments correspondant au débit sortant riche en microalgues, et épuisé en nutriments (Eppley, 1977). Ce système maintient un état d'équilibre (conditions de culture et taux de croissance stables). Dans notre expérimentation de type chémostat, l'apport en nutriment et en eau de mer est fixé pour une concentration maximale théorique, d'après nos travaux précédents printaniers, de 1,4 million de cellules par ml.

2.1. Structure expérimentale

Problématique

La littérature décrit principalement des cultures en continu en laboratoire et en petit volume (quelques litres). Les conditions environnementales (température, lumière) sont stables permettant de fixer un taux de renouvellement optimal de la culture. Dans notre cas, les facteurs climatologiques naturels ne sont pas contrôlés; le taux de croissance des algues peut varier en fonction de la température, de l'irradiance, de la salinité...

De ce fait, notre structure expérimentale (séries de bacs reliés) a été conçue dans le but de tester simultanément différents taux de renouvellement.

Description

La structure comprend trois parties : la structure de production de microalgues, l'alimentation en nutriments et l'alimentation en eau de mer (figure 1).

La structure de production de microalgues est composée de deux séries indépendantes (A et B) de 5 bacs subcarrés en résine polyester de surface 0,89 m², de hauteur utile 0,43 m, soit de volume unitaire 384 litres. Le volume total en eau est de 1920 litres par série. La circulation de l'eau entre les bacs s'effectue gravitairement par l'intermédiaire de tubes PVC "pression" (diamètre intérieur : 25 mm). Chaque bac est aéré par des diffuseurs d'aquarium qui fournissent 3,6L.min⁻¹.bac⁻¹ soit 0,56 L air.L eau⁻¹.h⁻¹. La production d'air est assurée par une pompe de 39W (Air pump Yasunaga Model LP-40A). L'eau de mer et les nutriments sont distribués dans le premier bac de chaque série. L'eau transite gravitairement de bac en bac et s'évacue du dernier bac de la série par surverse.

Les taux de renouvellement varient donc suivant les bacs; le renouvellement d'un bac (figure 1), correspond au volume total en culture depuis l'entrée générale du milieu de culture jusqu'au bac considéré. D'une manière générale, les taux de renouvellement inscrits sur les bacs sont proportionnels au volume d'eau en culture de ce bac jusqu'à l'entrée d'eau (figure 2A) : le taux de renouvellement d'un bac est de $X/(\text{place du bac dans la série})$ avec X =taux de renouvellement du 1^{er} bac.

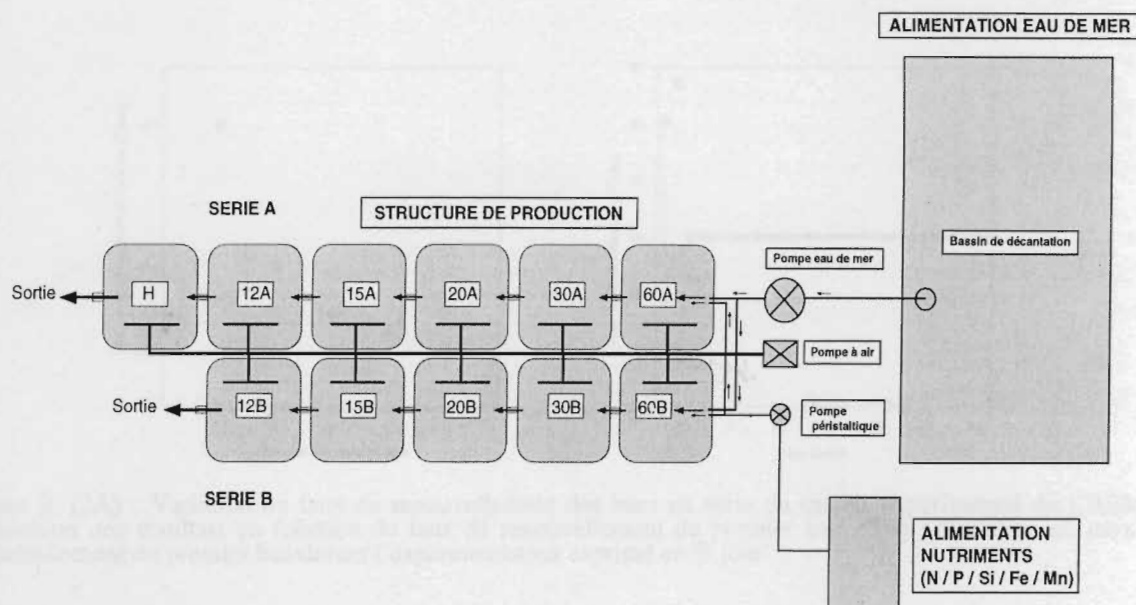


Figure 1 : Schéma de la batterie de bacs utilisée pour l'expérimentation de la culture continue. Les carrés blancs numérotés à l'intérieur des bacs correspondent au taux de renouvellement appliqué, exprimé en % du volume total par jour. Le dernier bac appelé H est indiqué à titre d'exemple pour simuler la présence d'huîtres en fin de production.

Lors de nos expérimentations le débit du premier bac a varié de 80 à 40 % la première semaine d'expérimentation. Il a ensuite été décidé de stabiliser le taux de renouvellement par jour à 60% pour le premier bac (figure 2B). Le deuxième bac était renouvelé à 30%, le troisième à 20%, le quatrième à 15% et le dernier à 12% (tableau 1). Ainsi, l'eau renouvelée sort du système de production en 8,3 jours.

Tableau 1 : Expression du renouvellement en eau correspondant aux différents bacs de chaque série exprimé en taux de renouvellement par jour (T), en temps de résidence (TR) par heure et par jour.

	BAC 1	BAC (1-2)	BAC (1-3)	BAC (1-4)	BAC (1-5)
T ($\%.j^{-1}$)	60	30	20	15	12
TR ($.h^{-1}$)	40	80	120	160	200
TR ($.j^{-1}$)	1,7	3,3	5,0	6,7	8,3

L'alimentation en nutriments est effectuée par une pompe péristaltique Ismatec Reglo à 4 canaux, 8 galets, réglée à 16% du débit maximum et équipée de 2 tubes Tygon translucides (diamètre intérieur : 2,29 mm). Les nutriments sont pompés dans deux récipients distincts (un par série de bacs), de contenance 30 litres, soit une autonomie de 6 jours, recouverts de sacs plastiques isolant les récipients de la lumière et du froid. La solution nutritive est couplée à l'arrivée d'eau de mer dans le premier bac de chaque série. Le débit de solution nutritive par série de bac correspond à 2% du débit d'eau de mer, soit $3,47 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, ou $5 \text{ L}\cdot\text{jour}^{-1}$ pour un renouvellement du premier bac de 60% par jour.

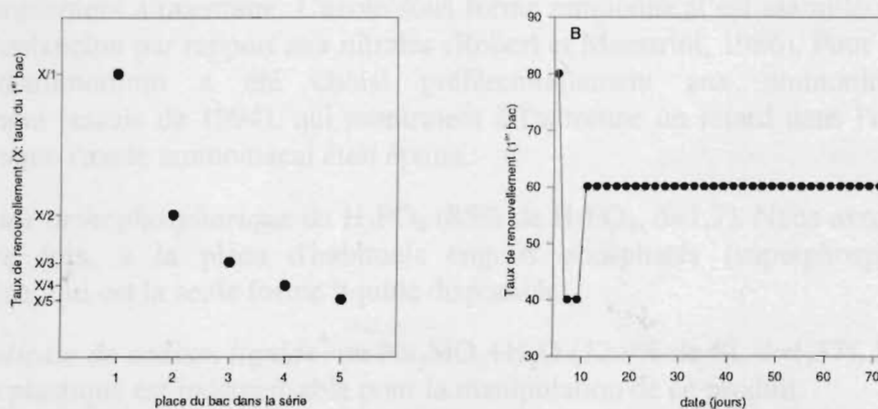


Figure 2. (2A) : Variation du taux de renouvellement des bacs en série du marais expérimental du CREMA. Expression des résultats en fonction du taux de renouvellement du premier bac. (2B) : Variation du taux de renouvellement du premier bac durant l'expérimentation exprimé en $\% \cdot \text{jour}^{-1}$.

L'alimentation en eau de mer est effectuée par l'intermédiaire d'un bassin décanteur en béton de 24 m^3 et de hauteur d'eau 1 m : l'eau est collectée dans une réserve (bassin creusé en terre), qui se remplit par gravité lors de coefficients importants (>70); puis elle est filtrée à $200 \mu\text{m}$ et reprise par l'intermédiaire d'une pompe immergée pour remplir le bac décanteur. L'eau ne subit aucune stérilisation; seule une décantation passive permet d'apporter dans la culture continue, une eau appauvrie en matière particulaire. Le renouvellement du bassin de décantation est réalisé tous les mois. Une pompe péristaltique Watson Marlow 504 U, équipée de 2 têtes 303 (une par série de bacs) et d'un tuyau Norprène noir (diamètre intérieur : $3,2 \text{ mm}$), réglée à 75% du débit maximum, fournit le débit nécessaire à la structure de production phytoplanctonique, soit $160 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ou $230,4 \text{ L} \cdot \text{jour}^{-1}$ pour un renouvellement du premier bac de 60% par jour. L'eau à nouveau filtrée à $200 \mu\text{m}$ à l'entrée de la pompe, est acheminée à la structure par 2 tuyaux Tubeclair translucides gainés en PVC noir.

2.2. Milieu nutritif

Les nutriments employés

Le milieu de culture utilisé pour l'expérimentation est une formulation récemment mise au point, contenant 3 sels nutritifs et 2 métaux, indispensables à la production automnale de diatomées: azote, phosphore, silice, fer et manganèse (Hussenot et al., 1997). Les expériences précédentes (Hussenot et al., 1995) ont démontré qu'un milieu simplifié devait impérativement à l'automne, où les conditions de lumière sont limitantes, contenir des métaux, notamment le fer qui favorise la photosynthèse (Bougis, 1974), et le manganèse. D'autre part, les essais en 1994 (Hussenot et al., 1995) n'avaient pas mis en évidence l'efficacité de l'EDTA, généralement ajouté avec l'élément fer. Il a donc été supprimé permettant de réduire considérablement le coût du milieu de culture.

Dans cette expérimentation, des modifications ont été apportées pour proposer un apport liquide pouvant être distribué automatiquement sous forme d'une solution unique et concentrée, réduisant ainsi les équipements de distribution et la main d'oeuvre. Les nutriments sont des monocomposants à usage agricole ou industriel (produits Langlois Chimie).

N : le *chlorure d'ammonium* ou NH_4Cl (produit agricole à 26,2 % de N), sert en élevage comme complément alimentaire. L'azote sous forme ammoniacal est assimilé prioritairement par le phytoplancton par rapport aux nitrates (Robert et Maestrini, 1986). Pour cette raison, le chlorure d'ammonium a été choisi préférentiellement aux ammonitrates, utilisés précédemment (essais de 1994), qui montraient à l'automne un retard dans l'assimilation du nitrate, lorsque l'azote ammoniacal était épuisé.

P : l'*acide orthophosphorique* ou H_3PO_4 (85% de H_3PO_4 , $d=1,7$). Nous avons utilisé, pour la première fois, à la place d'habituels engrais phosphatés (superphosphates), l'acide phosphorique, qui est la seule forme liquide disponible.

Si : le *silicate de sodium liquide** ou $\text{Na}_2\text{SiO}_3+\text{H}_2\text{O}$ (12,9% de Si, $d=1,37$). L'utilisation de matériel en plastique est indispensable pour la manipulation de ce produit.

Les éléments métalliques (fer et manganèse) ont aussi été apportés dans les cultures sous forme de produit monocomposant à usage industriel :

Fe : le *perchlorure de fer liquide** ou $\text{FeCl}_3, 6\text{H}_2\text{O}$ (14% de Fe, $d=1,45$). Le stockage et l'utilisation de ce produit impliquent une grande précaution d'emploi (très corrosif) et l'usage de récipients plastiques ou en verre.

Mn : le *sulfate de manganèse** ou $\text{MnSO}_4, \text{H}_2\text{O}$ (31% de Mn).

Les apports souhaités

Les nutriments dans cette expérience ne devaient pas être un facteur limitant de la biomasse produite. L'apport d'azote de 350 μmol par litre devait permettre de produire, d'après nos travaux précédents réalisés au printemps, plus d'un million de cellules par ml (tableau 2).

Tableau 2 : Rapport atome/atome de l'essai de culture en continu et concentration des nutriments en μM (ou $\mu\text{mol.L}^{-1}$).

	N	P	Si	Fe	Mn
Rapport molaire de l'essai	10	1	4	0,2	0,1
Concentration de l'essai	350	35	140	7,0	3,5

La préparation de la solution

Certains nutriments sont très acides, d'autres très alcalins. Une stabilisation du pH à environ 2 grâce à de l'acide chlorhydrique pur, permet de résoudre les problèmes de précipitation notamment entre la silice ($\text{pH}=11$) et les autres nutriments (Borges, 1986; Jacques, 1979).

Pour fabriquer 30 litres de solution concentrée donnant une autonomie de 6 jours à un module de 5 bacs, les éléments sont préalablement dissous, selon l'ordre donné dans le tableau 3, dans un bêcher contenant 5 litres d'eau douce, avec une agitation magnétique permanente. La silice est ajoutée dans l'eau ce qui rend le pH très alcalin (environ 10,6). Le pH est rétabli à 2 avec 20 mL d'acide chlorhydrique technique ($d = 1,77$), à 33,3% de HCl. Les autres éléments sont ajoutés ensuite dans l'ordre suivant : phosphore, azote, manganèse et fer. Le pH diminue légèrement et se stabilise à 1,83. La solution mère est stable (pas de précipité). Les 25 litres restants d'eau douce brute ($\text{pH}=7,6$) sont tamponnés à $\text{pH}=2$ avec 30 mL de HCl. La solution mère est mélangée ensuite aux 25 litres sans risque de création de précipité.

* produit Langlois Chimie

Tableau 3 : Evolution du pH avec l'ajout des différents produits commerciaux dans l'eau douce pour la préparation de la solution nutritive.

Produits	mL	g	pH obtenu
Solution mère (5 litres)			
H ₂ O	5000,00		7,64
Silicate de soude	38,20		10,64
Acide chlorhydrique	20,00		2,12
Acide phosphorique	3,30		2,00
Chlorure d'ammonium		25,70	1,93
Sulfate de manganèse		0,86	1,93
Chlorure de fer	2,64		1,83
Eau douce (25 litres)			
H ₂ O	25000,00		7,64
Acide chlorhydrique	30,00		1,96

Cette dissolution de la solution mère au 1/6^e permet de distribuer les éléments nutritifs avec un débit compatible avec notre matériel de distribution (débit mini : environ 3 mL.min⁻¹). Pour de plus grands volumes, aucune dilution ne sera effectuée. Il était même à envisager une concentration de la solution mère.

2.3. Gestion et suivi de la culture

Les analyses journalières

Quotidiennement à 16 heures, la température, la salinité (WTW LF 196), l'oxygène dissous (WTW OXI 196), sont mesurées *in situ* sur chaque bac. Un prélèvement de 80 mL dans chaque bac a été réalisé pour les analyses traitées immédiatement au laboratoire de terrain : le pH est mesuré (pH-mètre KNICK PORTAMESS 752 Calimatic); l'évolution de la biomasse phytoplanktonique est suivie par l'absorption *in vivo* à 680 nm (spectrophotomètre HACH DR2000), et la fluorescence *in vivo* (fluorimètre Turner Designs AU 10). Des mesures automatisées (centrale LI-COR LI 1000) sont enregistrées toutes les 15 minutes pour l'irradiance naturelle dans l'air et pour la température de l'eau dans le bac 20% de renouvellement du 22/10/96 au 22/12/96.

Les analyses détaillées en phase de stabilité de la culture

Il a été décidé d'approfondir les observations par des analyses supplémentaires aux analyses de routine lorsque la culture continue serait en phase stationnaire. La première s'est déroulée au 8^{ème} jour (30/10/96) sur la série A et B, la seconde aux 35 et 36^{ème} jour (26-27/11/96) sur la série A' et B et la dernière aux 57 et 58^{ème} jour (18-19/12/96) sur la série A'. La réserve et le milieu de culture ont été prélevés afin d'évaluer la dissolution des nutriments dans l'eau de mer et de connaître les éléments totaux pénétrant dans la culture (auto analyseur Skalar). Cinq comptages cellulaires ont été effectués sur cellule de Malassez pour chaque culture. Des dosages de chlorophylle *a* et phéopigments ont été réalisés par extraction au méthanol (fluorimètre Turner 112). La méthode de ces analyses est décrite en annexe 1.

2.4. Calendrier expérimental

La série A a été utilisée jusqu'au 21^{ème} jour (12/11/96 : tableau 4). Elle a été nettoyée puis réemployée sous le nom de série A' pour une culture en continu avec nettoyage des parois fréquent (tous les 2 jours environ). La série B a été utilisée jusqu'au 45^{ème} jour (6/12/96) sans

nettoyage, afin d'aborder l'influence du nettoyage sur la croissance et la quantité de biomasse maximale de *Skeletonema costatum*. L'expérimentation a été arrêtée au 61^{ème} jour. Une population d'huître avait été mise en place à partir du 56^{ème} jour. Les conditions climatiques extrêmes (-10°C pendant 15 jours), ont conduit à arrêter (gel des bacs) l'essai d'affinage au bout de 9 jours, initialement prévu sur une durée d'un mois (durée normale d'affinage d'huître en claire).

Tableau 4 : Récapitulatif du déroulement de l'expérimentation de la culture en continu au marais expérimental du CREMA. R: renouvellement du 1^{er} bac en %·jour⁻¹; [N]: concentration en azote de l'eau de dilution (eau de mer + milieu nutritif) en µM et date de nettoyage des séries A ou B.

Jour	Date	R	[N]	Nettoyage		Divers
				A	B	
j0	22/10/96	80	350	non	non	mise en eau séries A, B
j3	25/10/96	40	175	non	non	
j6	28/10/96	60	350	non	non	
j8	30/10/96	60	350	non	non	analyses détaillées
j21	12/11/96	60	350	oui	non	arrêt série A lancement série A'
j27	18/11/96	60	350	oui	non	
j34	25/11/96	60	350	oui	non	réserve remplie
j35	26/11/96	60	350	oui	non	analyses détaillées
j36	27/11/96	60	350	oui	non	analyses détaillées
j41	2/12/96	60	350	oui	non	
j45	6/12/96	60	350	oui	non	arrêt série B
j49	10/12/96	60	350	oui	non	
j51	12/12/96	60	350	oui	non	
j56	17/12/96	60	350	oui	non	huître en sortie des bacs réserve remplie
j57	18/12/96	60	350	oui	non	analyses détaillées
j58	19/12/96	60	350	oui	non	analyses détaillées
j59	20/12/96	60	350	oui	non	
j61	22/12/96	60	350	oui	non	arrêt du suivi des bacs
j63	24/12/96	60	350	oui	non	
j65	26/12/96	60	350	oui	non	arrêt de l'expérimentation

III - RESULTATS

3.1. Conditions climatiques durant l'expérimentation

D'après les données météorologiques, les températures moyennes de l'air pour les périodes expérimentales concernées, sont de 13,9°C pour le mois d'octobre 96, de 9,7°C pour le mois de novembre 96, et de 7,5°C pour le mois de décembre 96 (figure 3). Les précipitations ont montré un pic important le 28^{ème} jour. L'irradiance moyenne (figure 4A) au cours de l'expérimentation est de 9,8 moles quanta.m⁻².j⁻¹ ($\sigma_{n-1} = 5,5$), soit 5 fois moins d'énergie qu'en été (Comte, 1996). Elle peut atteindre des maxima de 24 moles quanta.m⁻².j⁻¹, et des minima de 3 moles quanta.m⁻².j⁻¹.

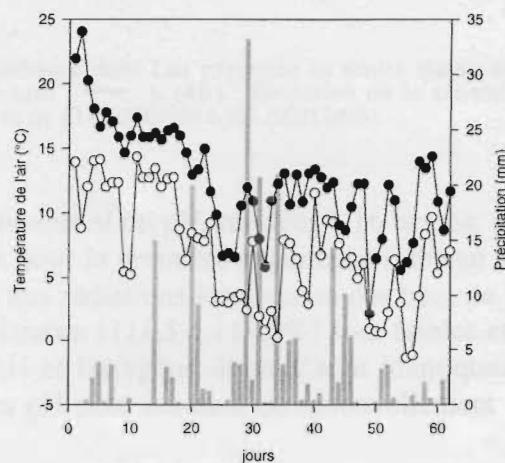


Figure 3 : Evolution des températures de l'air minimum (○) et maximum (●) et des précipitations (■) pendant la durée des expérimentations. Observations quotidiennes réalisées par la station météorologique de Météo France de La Rochelle.

3.2. Evolution journalière des cultures continues de *Skeletonema costatum*

3.2.1. Qualité physico-chimique

Température et salinité de l'eau

La température moyenne (figure 4A) dans les bacs d'expérimentation est de 9,1°C ($\sigma_{n-1} = 4,1$). Elle subit des variations journalières pouvant atteindre 10°C, de par la faible inertie des bacs (petit volume). La température de l'eau en début d'expérimentation était environ de 12°C, et en fin d'expérimentation de 7°C. Des minima de +1°C dans les bacs ont été relevés en fin d'expérimentation, sans que l'espèce phytoplanctonique ne soit affectée (chute du bloom). La salinité (figure 4B) en début d'expérimentation est de 35‰, et chute rapidement le 28^{ème} jour à 27‰ en raison de fortes précipitations (figure 3) à cette période, et du faible renouvellement des bacs. Plus précisément, jusqu'au 21^{ème} jour (série A stoppée), les moyennes quotidiennes pour la température de l'eau et la salinité sont respectivement de 14,9°C à 15,6°C et de 33,5‰ à 34,1‰ (tableau 5A), et du 22^{ème} au 45^{ème} jour (série B stoppée), de 9,2°C à 9,8°C et de 28,5‰ à 29,4‰ (tableau 5B). La température enregistrée dans la série A est toujours supérieure à celle de la série B. Ceci s'explique par le positionnement des bacs de la série B, qui reçoivent préférentiellement les rayons latéraux du soleil couchant.

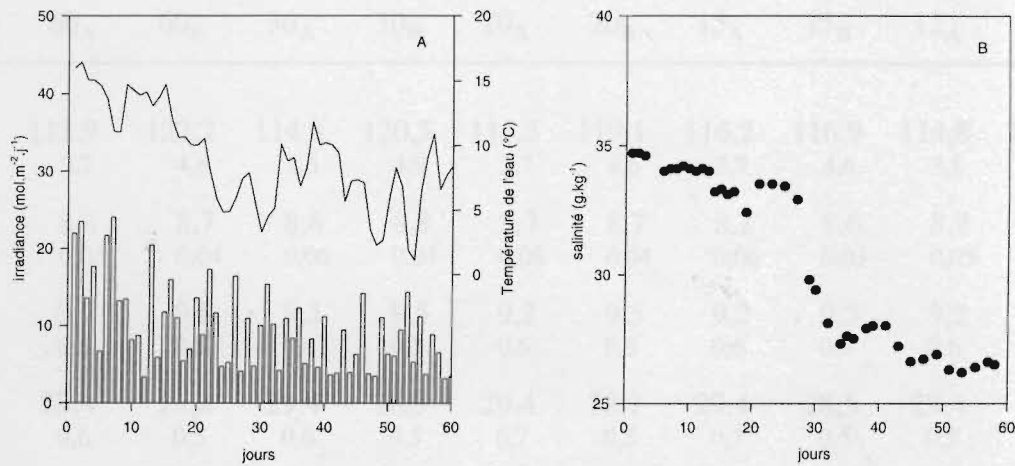


Figure 4. (4A) : Evolution de l'irradiance dans l'air exprimée en moles quanta.m⁻².j⁻¹ (□) et température moyenne de l'eau en °C sur 24 heures (—). (4B) : Evolution de la salinité dans les bacs expérimentaux (•). La période expérimentale va de j0 (22/10/96) à j61 (22/12/96).

Oxygène dissous et pH

Les moyennes de l'oxygène dissous et du pH, relevées à 16 heures, sont plus importantes dans la série B que dans la série A pour la première expérience (tableau 5A). Ceci peut s'expliquer par une meilleure exposition aux radiations lumineuses des bacs de la série B. Les valeurs de pH (8,6 à 8,9) et d'oxygène dissous (111,5 à 119,9%) sont faibles et stables. Du 21 au 45^{ème} jour, les tendances pour le pH et l'oxygène dissous sont identiques à la période précédente (tableau 5B), à l'exception du pH pour les taux de renouvellement 15 et 12%.j⁻¹, supérieurs dans la série A'.

Tableau 5 : Valeurs moyennes et écarts types (σ_{n-1}) de l'oxygène dissous exprimé en % de saturation, du pH, de la température de l'eau (°C) et de la salinité (g.kg⁻¹), pour chaque bac (B) de l'expérimentation à taux de renouvellement distincts (de 15 à 60% par jour) de la série A et B, et la réserve d'eau neuve (R). Les prélèvements ont été effectués à 16 heures. (5A) : j1 (23/10/96) à j21 (12/11/96). (5B) : j21 (12/11/96) à j45 (6/12/96).

5 A

	60 _A	60 _B	30 _A	30 _B	20 _A	20 _B	15 _A	15 _B	12 _A	12 _B	R
O ₂	114,2	119,9	113,5	117,8	114,1	117,5	112,2	115,6	111,5	113,1	140,2
σ_{n-1}	2,1	2,8	2,3	3,0	2,4	2,8	2,4	2,5	2,4	2,7	5,0
pH	8,6	8,7	8,7	8,8	8,8	8,9	8,7	8,9	8,7	8,7	8,6
σ_{n-1}	0,07	0,06	0,07	0,08	0,08	0,09	0,08	0,09	0,08	0,10	0,03
T	15,4	15,6	14,9	15,2	14,8	15,2	14,7	15,2	14,7	15,2	14,3
σ_{n-1}	0,4	0,5	0,4	0,5	0,4	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,3
S	33,6	33,5	33,7	33,6	33,8	33,7	34,0	33,7	34,1	33,9	34,1
σ_{n-1}	0,1	0,2	0,1	0,2	0,2	0,3	0,2	0,3	0,2	0,3	0,1

5 B

	60 _A	60 _B	30 _A	30 _B	20 _A	20 _B	15 _A	15 _B	12 _A	12 _B	R
O ₂	112,9	122,2	114,8	120,5	116,3	119,1	116,2	116,9	114,8	114,6	130,2
σ_{n-1}	3,7	4,8	3,6	4,9	3,7	4,6	3,7	4,6	3,8	4,7	5,7
pH	8,4	8,7	8,6	8,8	8,7	8,7	8,7	8,6	8,7	8,4	8,5
σ_{n-1}	0,05	0,04	0,06	0,04	0,06	0,04	0,06	0,03	0,05	0,05	0,04
T	9,7	9,8	9,3	9,5	9,2	9,5	9,2	9,5	9,2	9,5	9,6
σ_{n-1}	0,6	0,5	0,6	0,5	0,6	0,5	0,6	0,5	0,6	0,6	0,5
S	29,4	29,2	29,4	28,9	29,4	28,7	29,4	28,5	29,4	28,5	29,4
σ_{n-1}	0,6	0,5	0,6	0,5	0,7	0,5	0,7	0,5	0,7	0,5	0,5

3.2.2. Biomasse microalgale par mesures *in vivo* (absorption à 680 nm et fluorimétrie *in vivo*)

Résultats chronologiques

Durant l'expérimentation, la qualité de l'eau entrante dans le système (réserve) était relativement constante en terme de biomasse, soit 5 en unités arbitraires de chlorophylle *in vivo* (FV) et 0,008 en unités de D.O. à 680 nm (DO) (figures 5 et 6). Les valeurs élevées en oxygène dissous dans le bassin de réserve (tableau 5), étaient indicatrices d'une intense production phytoplanktonique, provenant d'une population microalgale naturelle diversifiée non déterminée, incluant évidemment l'algue diatomée souhaitée *Skeletonema costatum*.

Pour les séries A et B jusqu'au 21^{ème} jour, l'évolution de la biomasse est identique quels que soient les taux de renouvellement : les séries évoluent jusqu'à un maximum de biomasse au 11^{ème} jour, qui atteint 0,163 (série A), et 0,153 (série B) en unités de DO, et 185 (série A), et 175 (série B) en unités de FV pour un renouvellement de 20%.j⁻¹. La culture chute ensuite constamment jusqu'au 21^{ème} jour, date d'arrêt de la série A.

Après 19 jours de croissance, la série A' atteint un plateau (figure 5 et 6). La culture se stabilise ensuite jusqu'à la fin de l'expérimentation. Les taux de renouvellement les plus performants sont 20%, 15% et 12%. Les biomasses atteignent 0,2 en unités de DO et 200 en unités de FV. Pendant la même période, les cultures de la série B périclitent. Les parois non nettoyées, sont recouvertes de microphytes fixés, compétiteurs de *Skeletonema costatum*. Il est à noter cependant que dans les bacs correspondant à 20%, 15% et 12% de renouvellement par jour de la série B, la biomasse augmentait en fin d'expérimentation. Ceci peut être expliqué en partie par la sénescence des compétiteurs de la diatomée ou de meilleures conditions de milieu pour sa croissance.

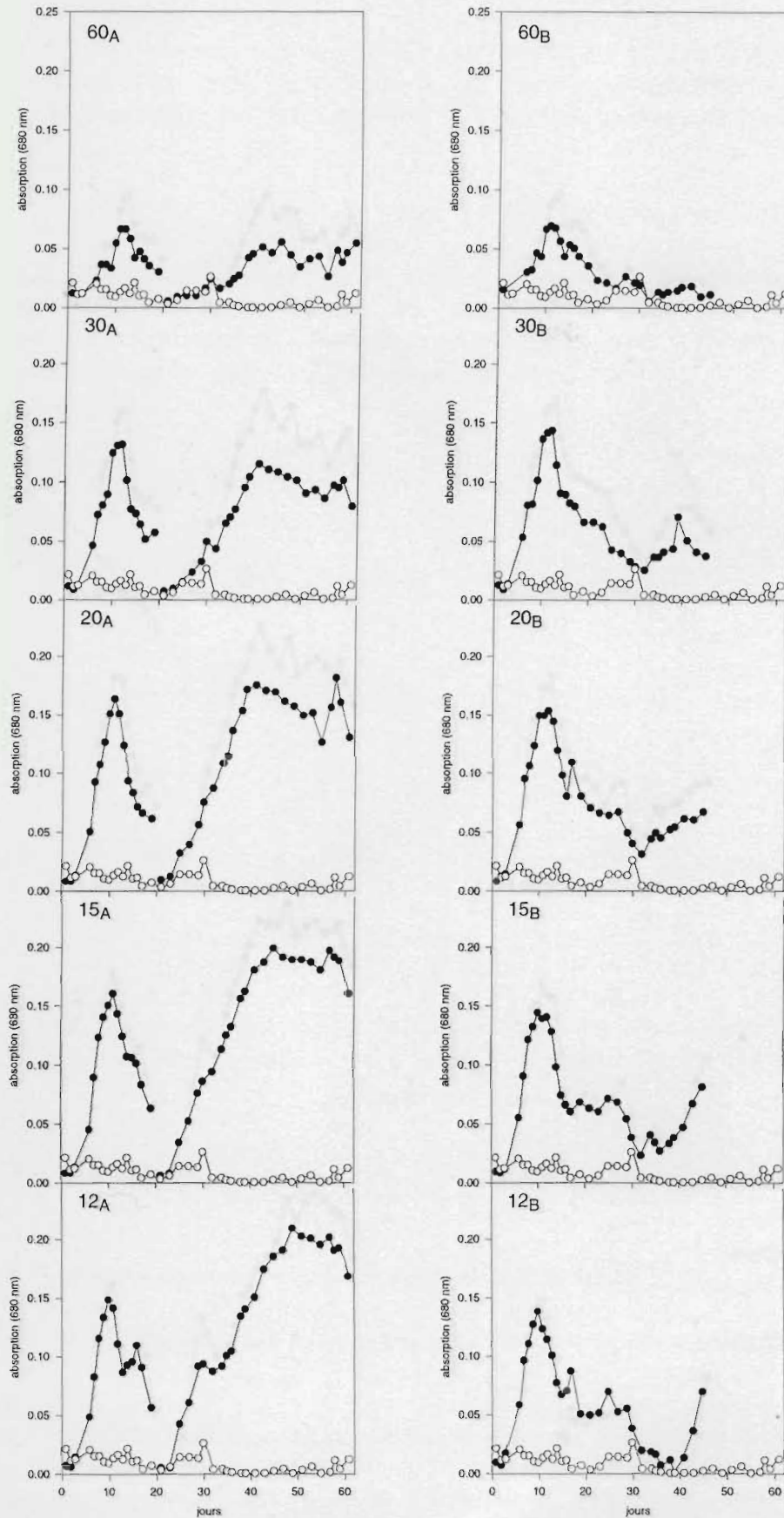


Figure 5 : Evaluation de la biomasse microalgale par mesure de l'absorption à 680 nm exprimée en unité d'absorption dans chaque bac (●) de la série A (j0, j21), A'(j21, j61) et B pour les différents taux de renouvellement ($60\%.j^{-1}$; $30\%.j^{-1}$; $20\%.j^{-1}$; $15\%.j^{-1}$; $12\%.j^{-1}$) et la réserve (○) de j1 (23/10/96) à j61 (22/12/96) à 16 heures.

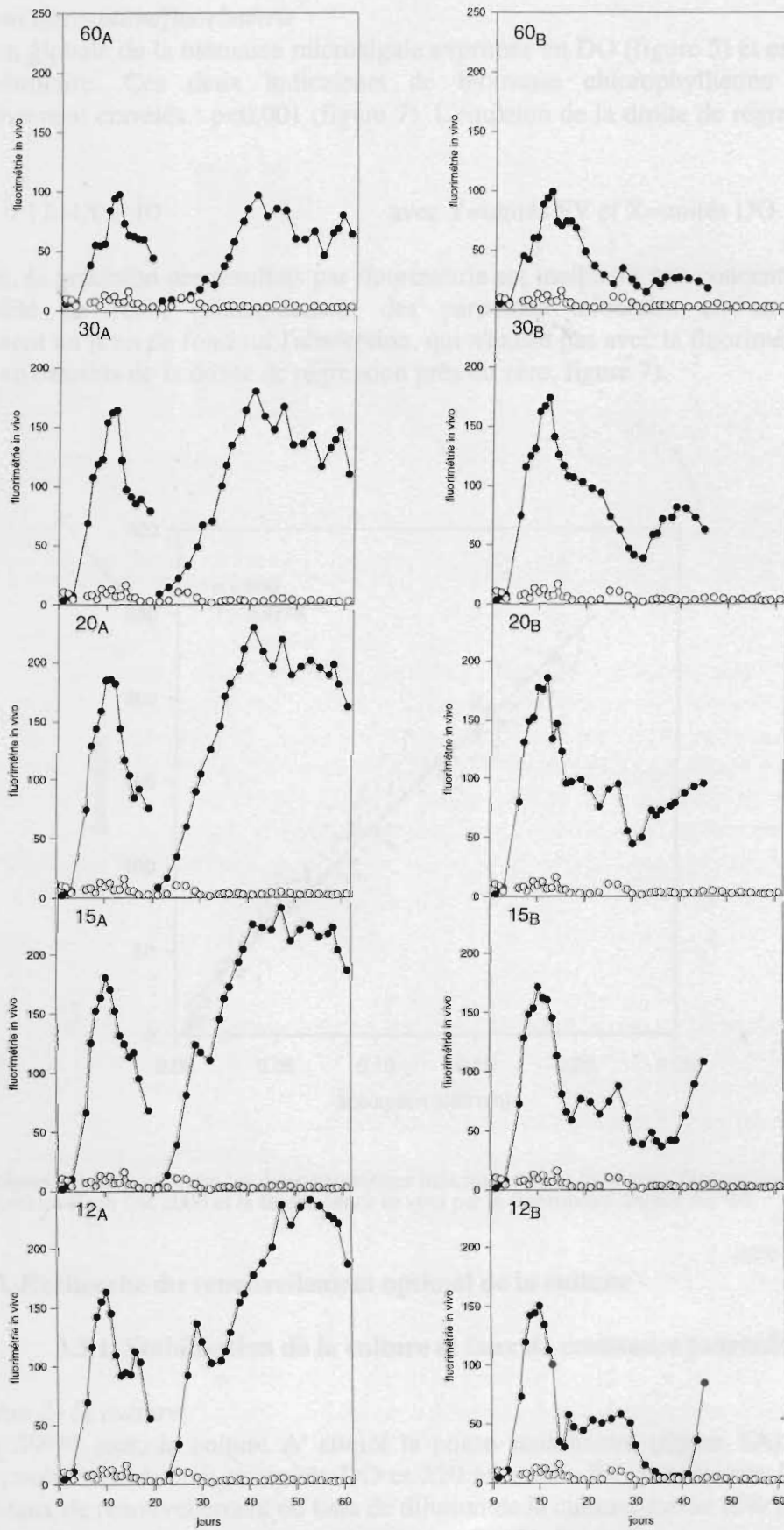


Figure 6 : Evaluation de la biomasse microalgale par mesure de la fluorimétrie in vivo exprimée en unité de fluorimétrie dans chaque bac (●) de la série A (j0, j21), A' (j21, j61) et B pour les différents taux de renouvellement (60%·j⁻¹; 30%·j⁻¹; 20%·j⁻¹; 15%·j⁻¹; 12%·j⁻¹) et la réserve (○) de j1 (23/10/96) à j61 (22/12/96) à 16 heures.

Corrélation absorption/fluorimétrie

L'évolution globale de la biomasse microalgale exprimée en DO (figure 5) et en FV (figure 6) semble similaire. Ces deux indicateurs de biomasse chlorophyllienne sont en fait significativement corrélés : $p < 0,001$ (figure 7). L'équation de la droite de régression est de la forme:

$$Y = 1144X + 10 \quad \text{avec } Y = \text{unités FV et } X = \text{unités DO} \quad (1)$$

Cependant, la précision des résultats par fluorimétrie est meilleure aux concentrations faibles. La turbidité de l'eau, principalement des particules minérales en suspension, crée probablement un bruit de fond sur l'absorption, qui n'existe pas avec la fluorimétrie (voir amas de points en dessous de la droite de régression près du zéro, figure 7).

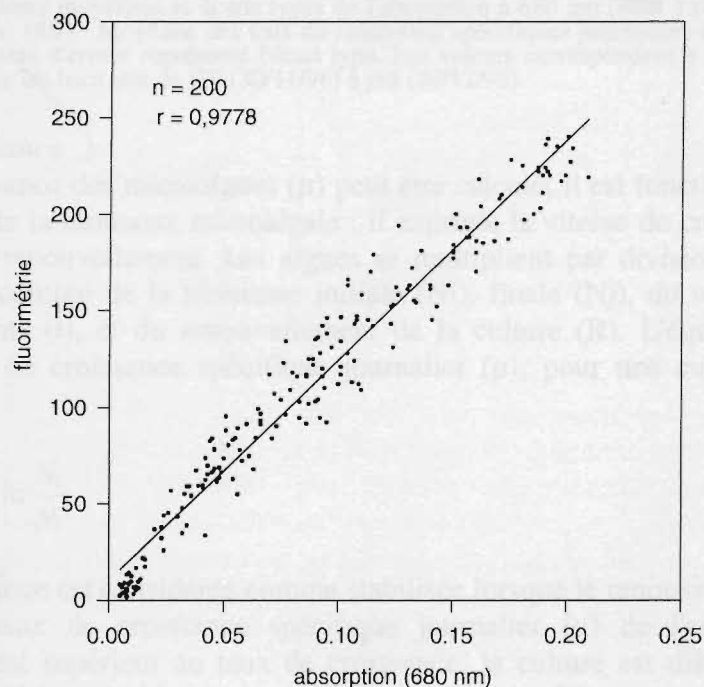


Figure 7 : Régression linéaire entre les deux paramètres indicateurs de la biomasse: l'absorption à 680 nm par le spectrophotomètre Hach DR 2000 et la fluorescence in vivo par le fluorimètre Turner AU 10.

3.3. Recherche du renouvellement optimal de la culture

3.3.1. Stabilisation de la culture et taux de croissance journalier

Stabilisation de la culture

Du 39 au 59^{ème} jour, la culture A' atteint la phase stationnaire (figure 8A). La biomasse maximale, soit environ 0,19 en unités DO et 220 en unités FV, est atteinte à cette période lorsque le taux de renouvellement ou taux de dilution de la culture, est de 15% par jour.

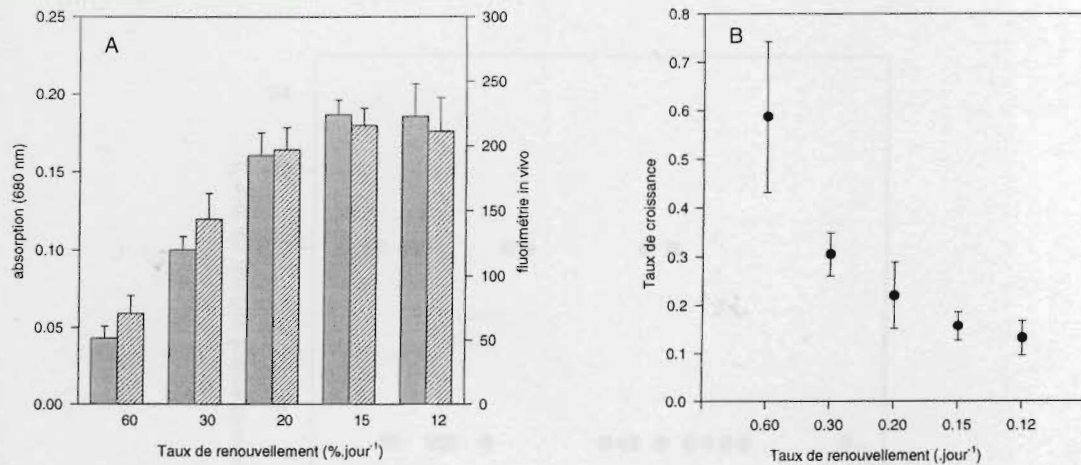


Figure 8. (8A) : Valeurs moyennes et écarts types de l'absorption à 680 nm (■) et de la fluorimétrie in vivo (▨) de la série A'. (8B) : Moyenne des taux de croissance spécifiques journaliers de la biomasse microalgale de la série A'. La barre d'erreur représente l'écart type. Les valeurs correspondent à la phase stationnaire de la culture continue dans les bacs soit de j39 (30/11/96) à j59 (20/12/96).

Le taux de croissance

Le taux de croissance des microalgues (μ) peut être calculé; il est fonction du renouvellement de la culture et de la biomasse microalgale : il exprime la vitesse de croissance et l'état de la culture selon le renouvellement. Les algues se multiplient par division binaire. Le taux de croissance tient compte de la biomasse initiale (N_i), finale (N_j), du temps écoulé entre les deux prélèvements (t), et du renouvellement de la culture (R). L'équation (2) permet de calculer le taux de croissance spécifique journalier (μ), pour une culture de type continu (Eppley, 1977) :

$$\mu = R + \frac{1}{t} \ln \frac{N_j}{N_i} \quad (2)$$

Une culture continue est considérée comme stabilisée lorsque le renouvellement journalier (R) correspond au taux de croissance spécifique journalier (μ) de l'espèce cultivée. Si le renouvellement est supérieur au taux de croissance, la culture est diluée par l'apport d'eau neuve. S'il est inférieur, la biomasse atteint un nouvel équilibre pour que le renouvellement soit identique au taux de croissance.

Du 39 au 59^{ème} jour, phase de biomasse stable, le taux de croissance correspond au renouvellement (figure 8B). La culture est donc en état stationnaire.

3.3.2. Renouvellement optimal en fonction des conditions climatiques

En déterminant sur les données journalières, sur la série A et A', le bac présentant la biomasse maximale, il est possible de définir le renouvellement optimal (R_{op}) pour les conditions climatiques des dernières 24 heures. La figure 9 présente les taux de renouvellement optimaux selon les jours de culture de la série A et A'. Du 6 au 61^{ème} jour, les R_{op} sont 20%, 15%, et 12%. Le renouvellement optimal diminue au fur et à mesure de l'expérimentation : jusqu'au 15^{ème} jour, R_{op} est de 20%, puis du 15 au 48^{ème} jour de 15%, et enfin du 48 au 61^{ème} jour de 12%.

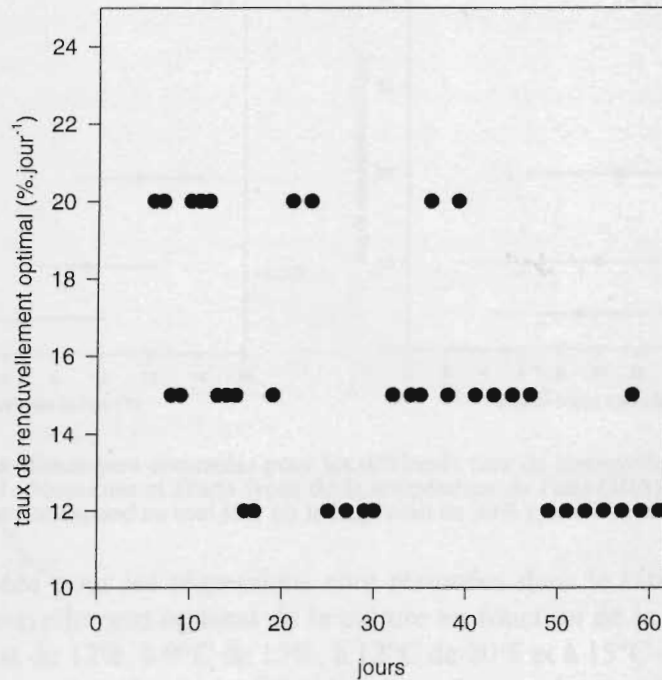


Figure 9 : Taux de renouvellement optimal (R_{op}) pour chaque jour de culture défini d'après le bac atteignant la plus forte biomasse quotidienne de la série A, A' de j6 à j61.

Suite aux résultats précédents, R_{op} a été relié aux conditions environnementales et plus particulièrement à la température de l'eau et à l'irradiance. Il semble que R_{op} soit fonction de la température (figure 10A). En effet, une relation exponentielle a été établie, entre la température de l'eau et le renouvellement optimal (R_{op}), pour la période et les conditions climatiques d'expérimentation, soit une température de l'eau variant de 2-3°C à 15°C, et une irradiance, de 3 à 24 moles quanta.m⁻².jour⁻¹:

$$R_{op} = 5,4e^{(0,11t)} \quad \text{avec} \quad R_{op} : \text{en \%vol.jour}^{-1} \quad (3)$$

t : température de l'eau en °C

Les écarts types des valeurs moyennes de l'irradiance pour chaque R_{op} sont très importants (figure 10B); les données obtenues ne permettent pas d'établir de relation directe entre l'irradiance et le R_{op} , les deux variables température et irradiance ne pouvant pas être dissociées.

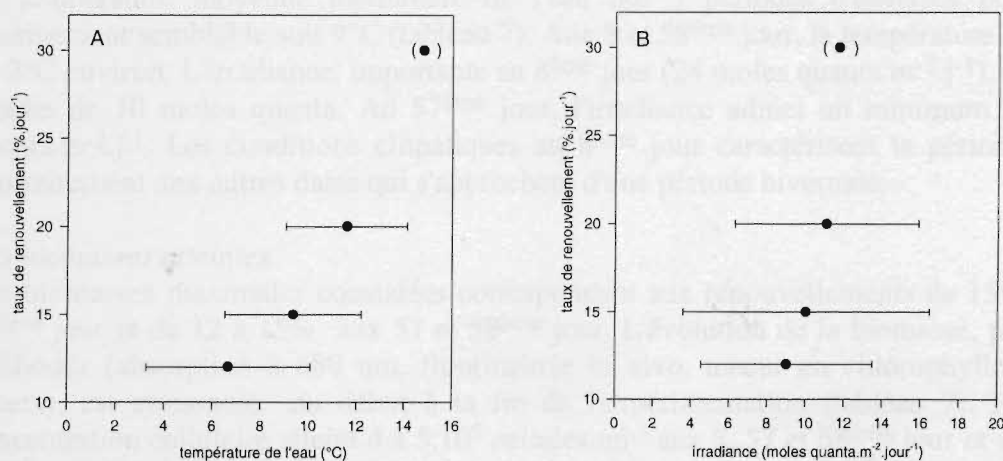


Figure 10 : Conditions climatiques constatées pour les différents taux de renouvellement optimaux (Rop.) de la série A, A' de j6 à j61. Moyennes et écarts types de la température de l'eau (10A) et de l'irradiance (10B). La valeur entre parenthèse correspond au seul jour où le Rop. était de 30% (série B).

Les données utilisées pour les régressions sont résumées dans le tableau 6 et permettent de déterminer un renouvellement optimal de la culture en fonction de la température de l'eau. A environ 7°C, R_{op} est de 12%, à 9°C de 15%, à 12°C de 20% et à 15°C de 30%.

Il est à remarquer que ces valeurs ont été obtenues en bacs polyester de 384 litres et de 40 cm de profondeur. Il est possible que les renouvellements optimaux pour des bassins de grand volume soient différents. L'irradiance reçue par les cellules pourrait être moins importante; les renouvellements optimaux seraient plus faibles.

Tableau 6 : Récapitulatif des conditions optimales climatiques pour les différents taux de renouvellement (exprimé en %). Moyennes et écarts types (σ_{n-1}) de la température de l'eau en °C (TEMP) et de l'irradiance en moles quanta .m⁻².jour⁻¹ (IRRAD).

	n. obs.	TEMP		IRRAD	
		Moy	σ_{n-1}	Moy	σ_{n-1}
12	21	6,7	3,3	7,9	4,2
15	18	9,4	2,8	9,8	5,7
20	12	11,6	2,4	11,1	4,6
30	1	14,8		11,7	

3.4. Analyses qualitatives et quantitatives ponctuelles sur les séries A et A'

3.4.1. Etat des cultures aux périodes d'observation

Au 8^{ème} jour, la culture était en phase de biomasse ascendante dans tous les bacs; aux 35 et 36^{ème} jour, la culture commençait à atteindre la phase stationnaire; aux 57 et 58^{ème} jour, la culture était stabilisée dans tous les bacs.

Les conditions environnementales

La température moyenne journalière de l'eau des 3 périodes d'analyses ponctuelles est relativement semblable soit 9°C (tableau 7). Aux 8 et 58^{ème} jour, la température est supérieure de 2°C environ. L'irradiance, importante au 8^{ème} jour (24 moles quanta.m⁻².j⁻¹), est en général proche de 10 moles quanta. Au 57^{ème} jour, l'irradiance admet un minimum de 3,8 moles quanta.m⁻².j⁻¹. Les conditions climatiques au 8^{ème} jour caractérisent la période automnale, contrairement aux autres dates qui s'approchent d'une période hivernale.

Les biomasses atteintes

Les biomasses maximales constatées correspondent aux renouvellements de 15% au 8, 35 et 36^{ème} jour et de 12 à 15% aux 57 et 58^{ème} jour. L'évolution de la biomasse, par différentes méthodes (absorption à 680 nm, fluorimétrie in vivo, teneur en chlorophylle *a*, pigments totaux), est croissante du début à la fin de l'expérimentation (tableau 7). Par contre, la concentration cellulaire atteint 4 à 5.10⁵ cellules.ml⁻¹ aux 8, 57 et 58^{ème} jour et seulement 3 à 4.10⁵ cellules.ml⁻¹ aux 35 et 36^{ème} jour.

Tableau 7 : Récapitulatif de la température de l'eau (TEMP) en °C, de la salinité (SAL) en g.kg⁻¹, de l'absorption à 680 nm (ABS max), de la fluorimétrie (FLUO max), du comptage cellulaire (CEL max.) en 10³ cellules.ml⁻¹, de la chlorophylle *a* (CHL max) et des pigments totaux (PTOT max) en µg.L⁻¹. Les indicateurs de biomasse annoncés correspondent au bac avec le taux de renouvellement en % () le plus performant le jour de l'observation.

	TEMP	IRRAD	SAL	ABS max	FLUO max	CEL max	CHL max	PTOT max
j8	11,1	24,0	34	123 (15)	152 (15)	493 (15)	390 (15)	406 (15)
j35	8,8	10,9	28	125 (15)	162 (15)	299 (15)	534 (15)	642 (15)
j36	9,0	8,4	28	136 (15)	181 (20)	370 (15)	648 (20)	742 (15)
j57	9,1	3,8	27	201 (12)	227 (12)	463 (12)	1628 (15)	1628 (15)
j58	10,9	8,8	27	191 (15)	224 (12)	440 (15)	1003 (15)	1313 (15)

3.4.2. Espèces phytoplanctoniques

L'utilisation d'eau de mer "naturelle"* dans le milieu de culture autorise un inoculum multispécifique. Cependant la diatomée en chaîne *Skeletonema costatum* est dominante (tableau 8). Les conditions fournies par le milieu enrichi favorisent la croissance préférentielle de cette espèce et lui permettent un taux de croissance rapide.

En amont du bac à taux de renouvellement optimal

La présence de *Melosira moniliformis*, genre appartenant au groupe des bacillariophycées, comme *S. costatum*, sur les parois au 8^{ème} jour, est due à l'absence de nettoyage des bacs de la série A. D'autres diatomées comme *Nitzschia sp.* ou de petites navicules, se sont fixées sur le tapis végétal recouvrant les parois. Ce phénomène est totalement inhibé par le bloom dense de *S. costatum* pour les bacs de renouvellement 30, 20, 15 et 12%.

En aval du bac à taux de renouvellement optimal

Après épuisement du milieu nutritif, la population de diatomées vieillit et un protiste (*Ebria tripartita*) prolifère; il se nourrit de protoplastes de *S. costatum*. Cet hétérotrophe a déjà été signalé dans les cultures automnales en grands volumes (Le Moine et al., 1995) et semble être présent dans les estuaires d'eaux tempérées (Nezan et Piclet, 1994).

* eau de mer "naturelle" : eau fraîchement pompée de la mer ne subissant aucune stérilisation des espèces indigènes

Tableau 8 : Détermination et estimation moyenne des espèces phytoplanctoniques présentes dans la réserve d'eau brute (R) et dans les bacs de culture à 60, 30, 20, 15 et 12 % de renouvellement par jour lors des analyses ponctuelles. ++++ : 99%; +++ : 90%; + : quelques individus; ε : rares individus.

	R	60	30	20	15	12
Diatomées						
<i>Skeletonema costatum</i>	ε	+++	++++	++++	++++	+++
<i>Melosira moniliformis</i>	ε	+	ε	ε	ε	ε
<i>Nitzschia sp.</i>	ε	ε	ε	ε	ε	ε
Navicules	ε	+	ε	ε	ε	ε
Dinophycées						
<i>Ebria tripartita</i>	ε	ε	ε	ε	ε	+

3.4.3. Nutriments

Concentration dans le milieu

Le milieu de culture réel (MIL) de rapport atomique N/P/Si de 10/1/4,4 est quasi identique au ratio théorique (THE) de 10/1/4 (tableau 9). A 30% de renouvellement, la consommation des nutriments s'effectue dans un rapport proche du rapport initial de 10/1/4. A un taux de renouvellement de 20%, le rapport N/P diminue de 2 fois et Si/P de 4 fois: la silice et l'azote deviennent alors les éléments limitants. A partir de 15% de renouvellement, nous pouvons considérer l'épuisement quasi total du milieu de culture soit le retour à la qualité de l'eau de mer de la réserve (EMR) avec appauvrissement de la silice toutefois.

Tableau 9 : Concentration moyenne et écarts types (δ) en $\mu\text{mol.l}^{-1}$ des nutriments dans les cultures en fonction des taux de renouvellement journalier, et rapports N/P/Si (atome/atome). Données correspondants à j35-j36 et j57-j58 de la série A'.

	Concentration μM			Rapport N/P/Si		
	N	P	Si	N	P	Si
THE	350,0	35,0	140,0	10,0	1,0	4,0
MIL	339,3 (17,8)	33,8 (1,8)	147,9 (4,1)	10,0	1,0	4,4
60	237,3 (15,0)	25,3 (2,0)	104,3 (1,6)	9,4	1,0	4,1
30	128,9 (9,6)	16,3 (2,4)	47,0 (9,5)	7,9	1,0	2,9
20	52,4 (7,3)	10,6 (1,3)	7,1 (3,8)	4,9	1,0	0,7
15	8,7 (5,2)	3,6 (1,3)	2,6 (1,1)	2,1	1,0	0,7
12	13,7 (9,4)	1,1 (0,4)	3,9 (2,6)	11,7	1,0	3,4
EMR	23,5 (6,1)	1,0 (1,0)	17,3 (10,1)	18,2	1,0	16,5

A 12% de renouvellement, la quantité d'azote total est supérieure à celle enregistrée pour une dilution de 15%. L'azote minéral est sous la forme nitrates essentiellement et provient probablement de la lyse des cellules et de la minéralisation bactérienne qui s'ensuit.

Consommation des nutriments

La consommation des nutriments essentiels N, P, Si a été rapportée à la production de 10 millions de cellules de *Skeletonema costatum* en absolu dans le tableau 10. Elle est calculée pour le bac atteignant la biomasse maximale. Les quantités de nutriments consommés sont de l'ordre de 5 à 11 μmoles pour l'azote, de 0,6 à 1,2 μmoles pour le phosphore, et de 3 à 5 μmoles pour la silice. Le rapport entre les trois éléments consommés est proche du rapport

théorique de 10/1/4 aux 35 et 36^{ème} jour. Celui-ci évolue vers 11/1/5 aux 57 et 58^{ème} jour. Au 8^{ème} jour, les résultats sont différents des autres périodes : la culture était encore en phase de croissance, ce qui ne permet pas de comparer les résultats avec les autres jours.

Tableau 10 : Consommation des nutriments exprimée en μmole pour produire 10^7 cellules de *Skeletonema costatum* en absolu à j35, j36, j57, j58 et rapports atomiques N/P/Si des éléments consommés par le phytoplancton pendant cette période.

	Consommation			Rapport N/P/Si		
	N	P	Si	N	P	Si
j8	4,74	0,70	3,02	6,8	1,0	4,3
j35	11,22	1,16	4,99	9,7	1,0	4,3
j36	8,22	0,79	3,71	10,4	1,0	4,7
j57	7,19	0,69	3,13	11,4	1,0	4,5
j58	7,13	0,64	3,30	11,2	1,0	5,2

3.4.4. Biomasse microalgale

3.4.4.1. Comptage cellulaire

L'évolution de la concentration cellulaire en fonction du renouvellement est similaire pour les trois périodes d'analyses (figure 11); la concentration maximale est atteinte pour 15% de renouvellement par jour. Au 8^{ème} jour, la concentration est supérieure aux 36 et 58^{ème} jour pour tous les taux de renouvellement. Ceci peut s'expliquer par des conditions climatiques plus favorables au développement de bloom phytoplanctonique. Malgré un enrichissement prévu pour obtenir 1,4 million de cellules par ml, la concentration atteinte est de 4 à $5 \cdot 10^5$ cellules, soit le 1/3 de la prévision.

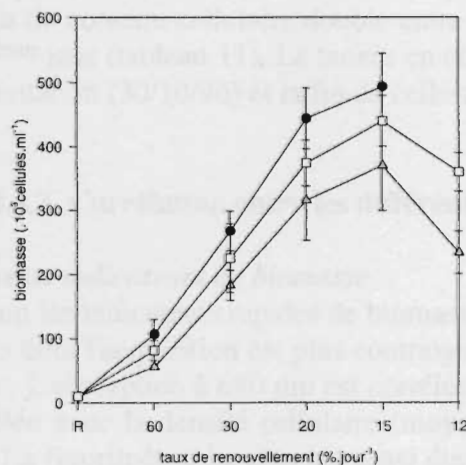


Figure 11 : Biomasse microalgale estimée par comptage cellulaire (5 réplicats par bac) pour les différents taux de renouvellement à j8 ou 30/10 (●), j36 ou 27/11 (▲) et j58 ou 19/12 (□).

3.4.4.2. Chlorophylle *a* et pigments totaux

Les teneurs en chlorophylle *a* et pigments totaux aux trois périodes d'analyse ne varient pas dans le même rapport que la concentration cellulaire (figure 12). Il apparaît qu'aux conditions climatiques hivernales, les teneurs en chlorophylle *a* et phéopigments sont plus importantes qu'aux conditions automnales. Au 8^{ème} jour, la teneur maximale en chl. *a* est de 390 $\mu\text{g.L}^{-1}$, au 36^{ème} jour de 650 $\mu\text{g.L}^{-1}$ et au 58^{ème} jour de 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

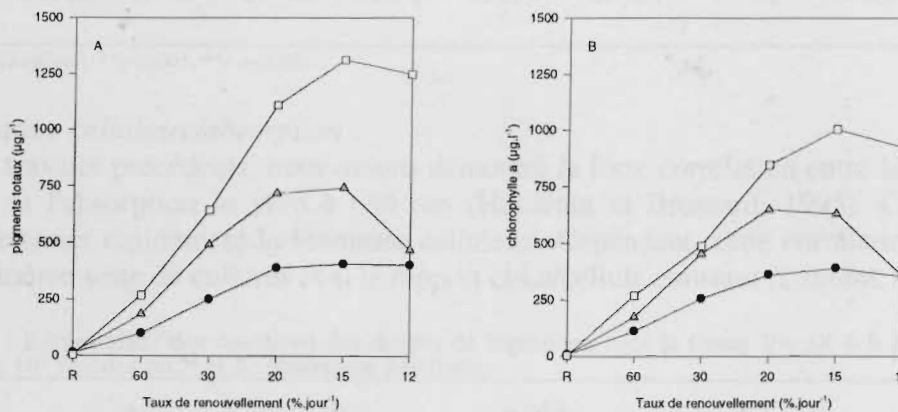


Figure 12 : Concentration en pigments totaux (A) et chlorophylle *a* (B) des différents taux de renouvellement de la culture continue exprimée en $\mu\text{g.L}^{-1}$ à j8 ou 30/10 (●), j36 ou 27/11 (△) et j58 ou 19/12 (□).

Tableau 11 : Composition en chlorophylle *a* du contenu cellulaire de *Skeletonema costatum*. Les valeurs correspondent à des μg de chlorophylle *a* pour 10^7 cellules.

	j8	j35	j36	j57	j58
$\mu\text{g chl } a$	7,9	17,9	17,0	32,1	29,9

La teneur en chlorophylle *a* du contenu cellulaire double entre le 8 et le 35^{ème} jour et double encore entre le 35 et le 57^{ème} jour (tableau 11). La teneur en chlorophylle est multipliée par 4 entre le début de l'expérimentation (30/10/96) et la fin de celle-ci (19/12/96).

3.4.4.3. Corrélation entre les différents paramètres

Corrélation entre les différents indicateurs de biomasse

Le tableau 12 met en relation les indicateurs rapides de biomasse (absorption et fluorimétrie in vivo) et d'autres indicateurs dont l'acquisition est plus contraignante (chlorophylle *a*, pigments totaux et densité cellulaire). L'absorption à 680 nm est corrélée avec tous les paramètres. Elle est cependant mieux corrélée avec la densité cellulaire (moy. $r^2=0,954$) qu'avec la teneur en pigments chlorophylliens. La fluorimétrie in vivo est aussi étroitement corrélée avec tous les paramètres de biomasse. Le coefficient de corrélation est plus important avec les pigments totaux sauf pour le 57 et le 58^{ème} jour. Si l'on compare les deux indicateurs de biomasse entre eux, les coefficients de corrélations sont plus élevés pour les valeurs de fluorimétrie in vivo.

Absorption-fluorimétrie/chlorophylle a

Précédemment, il a été démontré que le contenu cellulaire de *S. costatum* (teneur en chlorophylle *a* et pigments totaux) évoluait suivant les conditions climatiques et principalement entre la période hivernale et le reste de l'année. La corrélation absorption/densité cellulaire (ou fluorimétrie/densité cellulaire) est donc peu significative à l'automne, période de changements climatiques. Une estimation précise de la concentration cellulaire par simple lecture de l'absorption ou de fluorimétrie n'est donc pas possible. De ce fait, les régressions chlorophylle/absorption et chlorophylle/fluorimétrie (figure 14) ont été réalisées sur l'ensemble des données.

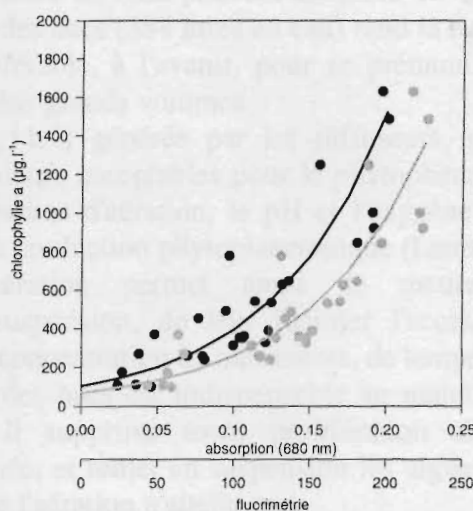


Figure 14 : Relation entre l'absorption à 680 nm (●) et la chlorophylle *a*, et la fluorescence in vivo (○) et la chlorophylle *a* réalisée avec les données de j8, j35-j36, j57-j58 et droites de régression. n: 28.

Les coefficients de corrélations r^2 de 0,83 (pour la fluorimétrie) et 0,82 (pour l'absorption) sont élevés et, de ce fait, les 2 variables sont fortement corrélées ($p < 0,001$). L'équation est de la forme exponentielle $Chla = e^{flu0}$ ou $Chla = e^{abs}$. Les valeurs de l'absorption et de la fluorimétrie peuvent être converties en unités de chlorophylle *a*, et dans ce cas pour toute la période de la culture continue automnale. Deux équations (4) et (5), ont été établies reliant d'une part la teneur en chlorophylle *a* et d'autre part l'absorption à 680 nm:

$$Y = 102,6 e^{(13,5 X)}$$

avec Y: teneur en chlorophylle *a* en $\mu g.L^{-1}$ (4)
et X: unités d'absorption

et d'autre part la teneur en chlorophylle *a* et la fluorimétrie in vivo:

$$Y = 69,9 e^{(0,01 X)}$$

avec Y: teneur en chlorophylle *a* en $\mu g.L^{-1}$ (5)
et X: unités de fluorimétrie

IV - DISCUSSION

4.1. La culture

La structure

La précision de la dilution (renouvellement) est fondamentale pour assurer une culture continue. Les pompes péristaltiques utilisées dans ces expérimentations se sont avérées plus performantes et plus fiables que les pompes à membrane utilisées précédemment.

Les variations de température de l'eau peuvent atteindre 10°C et celles de salinité 5‰ en 24 heures : le faible volume des bacs (384 litres en eau) rend la culture dépendante des conditions climatiques. Il serait préférable, à l'avenir, pour se prémunir de ces brusques fluctuations, d'utiliser des bassins de plus grands volumes.

L'aération ($0,55 \text{ L}_{\text{air}} \cdot \text{L}_{\text{eau}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) générée par les diffuseurs, permet de maintenir l'oxygène dissous et le pH à des valeurs acceptables pour le phytoplancton (110-120% pour l'O₂, 8,4 à 8,9 pour le pH). En l'absence d'aération, le pH et l'oxygène dissous atteignent des valeurs élevées pouvant limiter la production phytoplanctonique (Laurent, 1993; Richmond, 1986). Le brassage créé par l'aération permet aussi de mettre constamment les cellules phytoplanctoniques en suspension, de leur faciliter l'accès à la lumière, d'empêcher la formation de gradient de concentration de nutriments, de température, et de salinité.

Le nettoyage des parois des bacs est indispensable au maintien à long terme du bloom de *Skeletonema costatum*. Il supprime toute prolifération algale (*Melosira moniliformis*), compétitrice de la diatomée, et remet en suspension les algues déposées sur le fond dans les zones mortes des bacs que l'aération n'atteint pas.

Le milieu de culture

La dissolution de la solution mère dans la culture est satisfaisante : le rapport N/P/Si obtenu (10/1/4,4) est proche de celui que l'on souhaitait obtenir (10/1/4) dans le mélange "eau de mer+solution mère" (tableau 9).

Dès 15% de renouvellement, les nutriments sont totalement consommés. La silice et l'azote semblent limitants à 20 % de renouvellement (tableau 9). Le rapport N/P/Si d'assimilation pendant la phase de stabilisation de la culture continue (et pour une biomasse maximale) est proche de 11/1/5 (tableau 10). Il serait préférable d'adopter, pour les prochaines expérimentations, un rapport de ce type en modifiant les concentrations du milieu de culture, afin d'éviter une limitation de la croissance.

La biomasse atteinte

Les potentiels théoriques de production ($350 \mu\text{M}$ de N et rapport N/P/Si : 10/1/4 soit $1,4 \cdot 10^6$ de cellules.mL⁻¹) ne sont pas atteints. La culture admet un maximum de $4-5 \cdot 10^5$ cellules.mL⁻¹ soit une concentration cellulaire 3-4 fois inférieure aux prévisions. La consommation des nutriments, encore appelée "contenu cellulaire", (tableau 11) est de 7-8 μmoles en N, de 0,7 μmole en P et de 3-4 μmoles en Si pour 10^7 cellules. Ces consommations sont environ 3-4 fois supérieures à celles du printemps qui permettent de produire 10^7 cellules avec 2,5 μmoles de N, 0,25 μmole de P et 1 μmole de Si (Gautier et al., 1993). Par ailleurs il est montré que le contenu cellulaire de *Skeletonema costatum* contient 3 fois plus de chlorophylle *a* qu'au printemps (Froissard, 1994) soit environ $30 \mu\text{g} \cdot 10^7 \text{ cellules}^{-1}$ au lieu de $10 \mu\text{g}$ (tableau 14). Ces résultats confirment les observations faites sur des cultures de *S. costatum* à différentes intensités lumineuses par Hitchcock (1980), Sakshaug et al. (1989) et Yoder (1979), ou sur des cultures sur eau de forage par Brault et al. (1994), qui constatent qu'en lumière réduite, et

à température faible, la quantité de chlorophylle *a* par cellule augmente. En raison de la température faible, la division cellulaire diminue (Eppley, 1977).

Nous pouvons constater que la densité cellulaire est 3 fois moindre en automne, mais la teneur en chlorophylle *a* par cellule et la consommation en nutriments par cellule sont environ 3 fois supérieures à celles enregistrées au printemps (tableau 14). La solution en nutriment contrôlerait donc uniquement la quantité de chlorophylle produite, qui reste identique en automne et au printemps (tableau 14), et ne contrôlerait pas la densité cellulaire. En théorie, il faudrait donc tripler la quantité de nutriments à l'automne pour obtenir la concentration cellulaire du printemps, mais probablement les facteurs limitants, température et irradiance, ne permettraient pas d'atteindre de telles concentrations.

Tableau 14 : Comparaison de la production de biomasse phytoplanctonique au printemps et en automne, d'un milieu nutritif identique contenant 350 μM de N, 35 μM de P, 140 μM de Si (ratio: 10/1/4). La densité maximale atteinte est exprimée en cellules par ml. La consommation et la teneur en chlorophylle *a* sont rapportées à 10^7 cellules. La quantité de chlorophylle *a* (Q chl *a*) produite est exprimée en $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Les données du printemps sont celles de Froissard (1994), obtenues à partir de culture semi-continue.

Saison	Densité max.	Consommation			Chl a	Q Chl a
		N	P	Si		
printemps (P)	1 400 000	2,0- 2,3	0,2-0,3	0,8-0,9	10,0-11,8	1526
automne (A)	400 000	7,1-11,2	0,6-0,7	3,1-5,0	29,9-32,1	1240
rapport A/P	0,3	3,6 - 4,9	3,0-2,3	3,9-5,5	3,0 - 2,7	0,8

4.2. Les indicateurs de la biomasse pour le suivi de la culture

Similarité absorption-fluorimètre

Les indicateurs de biomasse sont indispensables au suivi de la culture. La méthode idéale pour des analyses routinières doit être rapide, fiable, de bonne précision et utilisant un faible volume d'échantillon. En accordance avec Butterwick (1982), nous considérons que la fluorimétrie *in vivo* et l'absorption, estiment la biomasse précisément, et très rapidement. Ces deux méthodes utilisent des échantillons frais de quelques dizaines de ml. Les résultats sont étroitement corrélés ($r^2=0,978$; $n=200$; équation (1)). Cependant les valeurs du fluorimètre sont plus précises à faible densité cellulaire. Pour une utilisation professionnelle, il serait possible d'employer un petit colorimètre beaucoup plus économique, à monolongueur d'onde se rapprochant de 680-690 nm.

Transformation des unités absorption-fluorimétrie

L'absorption comme la fluorimétrie mesure donc dans une colonne d'eau la teneur en pigments chlorophylliens ($r^2=0,82\sim0,83$; $n=28$). Sachant que la teneur en chlorophylle *a* est variable dans le contenu cellulaire des microalgues, on peut obtenir la densité cellulaire (unité: cellules. mL^{-1}), en effectuant auparavant une régression pour chaque condition de culture (température, irradiance, volume du bassin...), avec un comptage cellulaire sous microscope inversé. A l'heure actuelle, nous disposons d'équations utilisables pour nos périodes d'expérimentations (tableau 13). Celles-ci devront être validées sur d'autres cultures faites aux mêmes périodes de l'année.

4.3. Le renouvellement de la culture et la quantité de cellules produites

Renouvellement journalier

Dans le cadre de notre expérimentation, Le taux de renouvellement optimal à appliquer sur une culture continue automnale apparait, en grande partie, être fonction de la température et de l'irradiance, deux paramètres étroitement liés. En vue d'appliquer les résultats de cette étude, il est possible de proposer un renouvellement de notre structure pour lequel (i) la biomasse serait maximale et (ii) la consommation des nutriments serait totale en fonction de la température et de l'irradiance (tableau 15). L'équation (3) permet également de recalculer le renouvellement en fonction de la température de la culture. Néanmoins ces données sont à utiliser avec prudence et devront être validées sur de plus grands volumes de culture.

Tableau 15 : Renouvellements (%vol.j⁻¹) et temps de résidence (.j⁻¹) à appliquer en fonction de la température de l'eau (°C) et/ou du mois de l'année.

MOIS	Octobre	Début Nov.	Mi Nov/Début Déc.	Fin Déc.
Renouvellement	30	20	15	12
Temps de résidence	3,3	5	6,7	8,3
Température	15	11	9	6

Quantité de cellules produites

Lorsque le système a atteint une phase de stabilisation, la concentration cellulaire maximale était en novembre/décembre d'environ 4 à 5.10⁵ cellules par ml pour le bac à 15% de renouvellement par jour. La production par jour s'élevait à 10¹¹ cellules de *Skeletonema costatum* pour 1,5 m³ de culture ce qui correspondrait à la ration alimentaire théorique quotidienne de 120 huîtres (Baud *et al.*, 1995). Sur la même base de calcul, il faudrait 150 m³ de culture pour affiner une tonne d'huître.

4.4. Recherches à poursuivre

Les expérimentations réalisées durant l'automne 1996 ont permis de valider le procédé d'une culture en continu à bacs successifs en lumière naturelle. Cette première approche a montré l'adaptation de la production phytoplanctonique aux faibles niveaux d'irradiance de la période automne/hiver. Il reste à savoir (i) si la culture a atteint sa densité cellulaire limite ou si une quantité de nutriments supplémentaires autorise un accroissement de biomasse, (ii) si l'application en grand volume est réalisable, en bassin de terre muni ou non d'une bâche isolant le sédiment, (iii) s'il est possible d'homogénéiser et de mélanger une culture en grand volume pour maintenir une irradiance maximale de la colonne d'eau (forme des bassins, hauteur d'eau, type de mélangeur). Ces problématiques devront être engagées lors des travaux futurs.

V- CONCLUSION

Ces premiers essais de culture continue sur milieu "eau de mer enrichie" ouvrent des voies de développement nouvelles pour la maîtrise des cultures de masse d'algues fourrage intéressantes pour l'aquaculture marine basée à terre (écloserie-nourricerie de bivalves; écloserie de crevettes, de poissons; grossissement de mollusques et affinage d'huîtres). Les inquiétudes antérieures sur le facteur limitant de l'irradiance naturelle à l'automne, établies lors des essais de culture de masse en système non renouvelé, sont levées.

Il apparaît ainsi tout à fait réalisable de cultiver des diatomées dans les conditions climatiques (température et lumière) de l'automne et de l'hiver, en adoptant un système de culture continue. Ce système maintient des conditions de qualité d'eau (pH, O₂, substances inhibitrices auto produites par l'algue, ...) constantes et plus favorables à la croissance que dans les cultures non renouvelées. Le changement d'échelle nécessaire pour passer au développement de cette technique en conchyliculture de marais (télécaptage, affinage) nécessite toutefois des mises au point technologiques préalables, notamment sur la hauteur d'eau, le brassage de la culture, la quantité optimale d'azote à apporter, le rapport N/P/Si des composants de l'enrichissement azoté ayant été déterminé à 11/1/5. Dans le cadre d'un transfert recherche-profession, un dimensionnement pour une quantité d'huîtres donnée, à affiner, devrait être envisagé. Enfin, une comparaison économique entre "l'affinage-engraissement" et l'affinage traditionnel permettrait d'évaluer la rentabilité économique de cette nouvelle technologie.

Cette technique a permis de produire une biomasse très supérieure (17-20 g de matière sèche.m⁻².j⁻¹) à la production naturelle des marais à cette saison de l'année (0,3 g de matière sèche.m⁻².j⁻¹, Herbland, comm. perso.) et proche des cultures de masse de diatomées en extérieur (10-25 g de matière sèche.m⁻².j⁻¹, Goldman, 1979). Cela reste toutefois inférieur aux techniques les plus intensives (cultures fermées en photobioréacteur, Chaumont, 1993) et ne permet donc probablement pas d'envisager la technique décrite pour produire efficacement à un faible coût des pâtes d'algues, et éventuellement en extraire des composés biochimiques.

VI - BIBLIOGRAPHIE

- Baud JP (1988). Utilisation des eaux salées souterraines de la Baie de Bourgneuf pour le pré-grossissement intensif des mollusques filtreurs. Mémoire présenté pour obtenir le grade de Cadre de Recherche IFREMER, 127p.
- Baud JP, Brisset E, Cardinal M (1995). Affinage contrôlé en bassin de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Rapports Internes de la Direction des Ressources Vivantes de l'IFREMER RIDRV-9517-RA, Nantes, 35p.
- Benscheider K, Robinson RJ (1952). A new spectrophotometric method for determination of nitrite in sea water. J.Mar.Res. 11:87-96.
- Bodoy A, Prou J, Berthomé JP (1986). Etude comparative de différents indices de condition chez l'huître creuse (*Crassostrea gigas*). Haliotis 5:173-182.
- Borges MTM (1986). The effect of dilution rate on the species composition of microalgae obtained through induced blooms. Publicações do instituto de Zoologia "Dr Augusto Nobre" Faculdade de Ciências do Porto 197:1-14.
- Bougis P (1974). Ecologie du plancton marin. Tome I - Le phytoplancton. Masson et Cie, Paris VIe, 196p.
- Brault I, Baud JP, Haure J (1994). Faisabilité biologique de l'élevage intensif en bassin de l'huître plate *Ostrea edulis*. Rapports Internes de la Direction des Ressources Vivantes de l'IFREMER. RIDVR-94-21/RA-BOUIN., Bouin; France, 50p.
- Butterwick C, Heaney SI, Talling JF (1982). A comparison of eight methods for estimating the biomass and growth of planktonic algae. Br. Phycol. J., 17:69-79.
- Chaumont D (1993). Biotechnology of algal biomass production: a review of systems for outdoor culture. J Appl Phycol 5:593-604.
- Comte S (1996). Mise au point de la gestion d'une culture en continu de diatomées pour le traitement de effluents d'une pisciculture marine intensive. CREMA, L'Houmeau, 73p.
- Eppley RW (1977). The growth and culture of diatoms. In: Werner D (ed.) The biology of diatoms. Bot Monograph V.13. Blackwell Sci. Publish., Oxford, p 498 p.
- Froissard S (1994). Culture semi-continue de la diatomée marine *Skeletonema costatum* en microcosmes extérieurs. Perspectives d'application des cultures massives de microalgues. Thèse vétérinaire, Ecole nationale vétérinaire de Nantes, 91p.
- Gautier D, Blanchard G, Hussenot J, Rincé Y, Bertrand F, Joassard L, Mornet F (1993). Mass production of natural phytoplankton in nutrient enriched ponds: effect of mixing by aeration. In: Carrillo M, Dahle L, Morales J, Sorgeloos P, Svennevig N, Wyban J (eds) From Discovery to Commercialization. European Aquaculture Society, Oostende, Belgium, p 3.

- Gautier D, Ledu C, Hussenot J, Gerard A (1993). Production en masse de *Skeletonema costatum* en bassins extérieurs par fertilisation minérale : étude d'un cycle estival. Rapports internes de la Direction des Ressources Vivantes de l'IFREMER. IFREMER, DRV-93.033RA, CREMA L'Houmeau/La Tremblade, 26p.
- Goldman JC (1979). Outdoor algal mass cultures-I. Applications. *Wat. Res.*, 13:1-19.
- Guillard RRL (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Smith & WL MH Chanley (ed.) *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Plenum Press, New York, p 29-60.
- Hitchcock GL (1980). Influence of temperature on the growth rate of *Skeletonema costatum* in response to variations in daily light intensity. *Mar. Biol.*, 57:261-269.
- Hussenot J, Brossard N (1995). Premiers essais automnaux de culture en masse (24m³) de diatomées sur eau de mer fertilisée en N, P, Si. IFREMER Rapports Internes de la Direction des Ressources Vivantes, RI-DRV 95.02, L'Houmeau, 48p.
- Hussenot J, Brossard N, Lefebvre S (1997). Mise au point d'un enrichissement de l'eau de mer pour produire en masse des microalgues-diatomées comme fourrage pour les claires à huîtres. In: Buchet V, Hussenot J (eds) *Marais maritimes et aquaculture : préservation et exploitation des zones humides littorales*. Ifremer, Brest (sous presse).
- Hussenot J, Gautier D (1994). Techniques d'utilisation de la silice pour la production de masse des algues diatomées. synthèse des travaux 1989-1993. Rapports Internes de la Direction des Ressources Vivantes de l'IFREMER, RI.DRV-9403.RA/CREMA-L'HOUMEAU, L'Houmeau, France, 26p.
- Hussenot J, Gautier D (1995). Production en masse de micro algues en marais salés : bases biologiques, expérimentations, applications. In: Zanette & Y C Manzano (ed.) *Aquaculture en marais-Marisma y Acuicultura*. Région Poitou-Charentes-Junta de Andalucia, Le Château d'Oléron (France), p 1-12.
- Jacques G (Ed) (1979). *Phytoplankton. Biomasse, production, numération et culture*. Editions du Castillet, Perpignan, 107p.
- Koroleff F (1976). Determination of ammonia. In: *Methods of sea water analysis*, K Grasshoff (ed.). Verlag Chemie, Weinheim, RFA, p126-133.
- Laurent P (1993). Rapport de stage présenté pour l'obtention du DTSM "Génie biologique et productions marines". Optimisation de la culture de *Skeletonema costatum*, Nantes, 46p.
- Lawrence DR, Scott GI (1982). The determination and use of condition index of oysters. *Estuaries* 5:23-27.
- Le Moine O, Geairon P, Razet D, Soletchnik P, Faury N, Taillade S, Gouletquer P (1997). Optimisation de l'affinage en claires traditionnelles par complémentation en phytoplankton "fourrage". In: Buchet V, Hussenot J (ed.) *Marais maritimes et aquaculture*. Ifremer, Brest, (sous presse).

- Lefebvre S, Hussenot J, Brossard N (1996). Water treatment of land-based fish farm effluents by outdoor culture of marine diatoms. *J. Appl. Phycol.*, 8:193-200.
- Lorenzen CJ (1967). Determination of chlorophyll and pheopigments : spectrophotometric equations. *Limnol. oceanogr.* 12:343-346.
- Molina Grima E, Sanchez Perez JA, Garcia Sanchez JL, Garcia Camacho F, Lopez Alonso D (1992). EPA from *Isochrysis galbana*. Growth conditions and productivity. *Process Biochem* 27:299-305.
- Murphy J, Riley JP (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta* 27,31-36.
- Nezan E , Piclet G (1994). Guide pratique à l'usage des analystes du phytoplancton. Ifremer, Direction de l'Environnement et de l'aménagement du Littoral, 66p.
- Parrish CC, Wangersky PJ (1990). Growth and lipid class composition of the marine diatom, *Chaetoceros gracilis*, in laboratory and mass culture turbidostats. *J Plankt Res* 12:1011-1021.
- Richmond A (1986). Cell response to environmental factors. In: Richmond A (ed.) *Handbook of microalgal mass culture*. CRC Press, Boca Raton, Florida, p 69-99.
- Riva A, Lelong P (1978). Alimentation et croissance de bivalves filtreurs en bassin aménagé. ECOTRON. Mécanismes et contrôle de la production biologique marine - systèmes clos artificiels, écosystèmes littoraux. CNEXO, Brest, France, p 415-436.
- Robert JM, Maestrini SY (1986). Absorptions simultanées des ions NO_3^- et NH_4^+ par trois diatomées de claires à huîtres, en culture axénique. *Phycologia* 25:152-159.
- Schöllhorn E, Granéli E (1996). Influence of different nitrogen to silica ratios and artificial mixing on the structure of a summer phytoplankton community from the Swedish West coast (Gullmar Fjord). *J. Sea Res.*, 35:159-167.
- Sakshaug A, Andresen K, Kiefer DA (1989). A steady-state description of growth and light absorption in the marine diatom *Skeletonema costatum*. *Limnol. Oceanogr.* 34:198-205.
- Taub FB (1980). Use of continuous culture techniques to control nutritional quality. In: Shelef G, Soeder CJ (ed.) *Algae Biomass*. Elsevier, North-Holland Biomedical Press, p 705-721.
- Walsh DT, Kraus RA, Withstandley CA, Talin SN, Petrovits EJ (1985). Dimensioning of a mass algal culture facility for the temperate zone nursery culture of bivalve molluscs. *J. Maricul. Soc.* 16:451-463.
- Walsh DT, Withstandley CA, Kraus RA, Petrovits EJ (1987). Mass culture of selected marine microalgae for the nursery production of bivalve seed. *J. Shellfish Res.*, 6:71-77.
- Yoder JA (1979). Effect of temperature on light-limited growth and chemical composition of *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.*, 15:362-370.

Annexe 1: Méthodes d'analyses de la qualité de l'eau

Dosage des pigments chlorophylliens

Par fluorimétrie après extraction au méthanol (méthode O.R.S.T.O.M.)

Le dosage repose sur le principe que la chlorophylle *a* possède la propriété d'être fluorescente (maximum d'émission à 650-675 nm) quand elle est excitée par une lumière bleue (430-450 nm). Le fluorimètre utilisé est un Turner 112. La méthode consiste à mesurer la fluorescence avant (F_0) et après l'acidification (F_a) d'un extrait méthanolique de pigments. La diminution de fluorescence observée est en relation avec le pourcentage relatif de chlorophylle *a* par rapport à la somme (chlorophylle *a*)+(phéophytine *a*). Elle est très voisine de la méthode spectrophotométrique de Lorenzen (1967) dans son principe. La seule différence est qu'elle utilise la propriété de fluorescence des pigments plutôt que l'absorption de lumière. L'extraction où le méthanol remplace l'acétone est une méthode intéressante car l'extraction étant plus efficace, elle ne nécessite pas de centrifugation.

Après prélèvement d'une certaine quantité d'eau homogène, on filtre un volume connu précisément sur filtre Watman GF/C (25 mm de diamètre, 1,2µm de diamètre de pores) grâce à une pompe à vide. Le volume filtré dépend de la densité cellulaire de la culture. Le filtre est ensuite congelé pour une parfaite conservation de la chlorophylle en attendant son analyse au laboratoire. Pour le passage au fluorimètre, nous plaçons le filtre dans un tube à essai de petit diamètre pouvant contenir 10 ml de méthanol, l'extracteur, que nous rajoutons par la suite. L'extraction est complète au bout de 15 min. au réfrigérateur, mais il est conseillé d'attendre 1h bien qu'il n'y ait pas de différence remarquable selon l'O.R.S.T.O.M. Le tube à essai, une fois ramené à la température ambiante, est passé dans le fluorimètre qui nous indique une mesure de la fluorescence (F_0). Il faut par la suite acidifier l'extrait avec 50µl d'HCl 0,5 N et homogénéiser le mélange acide méthanol. On repasse l'échantillon pour la mesure de F_a . On applique ensuite les formules suivantes:

$$\text{Chl}a = \frac{F - F_a}{K - K_a} * \frac{v}{V} \qquad \text{Phéo}a = \frac{K * F_a - K_a * F}{K_a * (K - K_a)} * \frac{v}{V}$$

Chl *a* et phéo *a* exprimés en µg/l; v= volume de l'extrait méthanol 10 ml; V= volume filtré

K= facteur d'étalonnage du fluorimètre pour la chlorophylle *a* pure

K_a= facteur d'étalonnage du fluorimètre pour la phéophytine *a* pure

Par mesure in vivo d'absorption à 680 nm par spectrophotométrie

Le spectre d'absorption in vivo de *S. costatum* montre un pic à 680 nm caractéristique d'une des formes de chlorophylle *a* présente chez cette espèce (Baud comm. perso.). D'autre part, Laurent (1993) a montré la forte corrélation existant entre l'absorption in vivo à 680 nm chez *S. costatum* et la densité cellulaire ou la teneur en pigments totaux (Chl *a* + phéo *a*). L'utilisation d'un spectrophotomètre de terrain D.R 2000 Hach, nous permet d'avoir une appréciation immédiate de l'évolution de la culture. L'appareil a montré sa fiabilité lors des utilisations précédentes au C.R.E.M.A. Le dosage se fait directement sur le site, au moyen de petite cuve en verre adaptée à l'appareil.

Par mesure in vivo de la fluorescence

La mesure de la fluorescence in vivo est réalisée à l'aide d'un fluorimètre Turner Design AU10. L'échantillon d'eau brute est directement analysé. La méthode consiste à mesurer la fluorescence in vivo du phytoplancton présent dans l'eau afin d'obtenir une appréciation immédiate de la biomasse.

Le comptage cellulaire

Le comptage cellulaire est réalisé sous microscope inversé et sur cellule de Malassez. Grâce à une lamelle accolée à la cellule, on connaît précisément le volume de solution introduite à l'aide d'une pipette pasteur jetable. Un quadrillage gravé sur la cellule définit la zone représentative et permet un comptage aisé. Le volume de la cellule de Malassez est de 1mm^3 . D'après Laurent (1993), le comptage cellulaire est imprécis lorsque la densité cellulaire est faible. Il a montré que 10 comptages étaient nécessaires pour minimiser l'écart type et donc les erreurs. Les prélèvements sont fixés au formol à raison de 1% du volume prélevé. Leur conservation est ainsi optimum.

Le dosage des nutriments avec l'auto-analyseur SKALAR

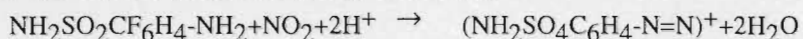
Le principe de base, reposant sur la loi de Beer-Lambert, est le suivant. Plusieurs échantillons sont injectés dans un flux liquide qui est segmenté par des bulles d'air. Différents réactifs sont ajoutés à des intervalles bien définis, dans des volumes bien déterminés. Les réactions s'effectuent après mélange, dilution, minéralisation ou réduction suivant les analyses effectuées. Il y a alors formation de complexes colorés présentant un maximum d'absorption à une longueur d'onde donnée; ces complexes sont détectés par mesures spectrophotométriques. L'auto-analyseur est constitué de plusieurs voies de mesure. Celui que possède le laboratoire permet de doser simultanément huit sels nutritifs: nitrite, nitrate, ammonium, urée, phosphate, silicate, phosphore total et azote total. Nous ne verrons en détails ici que les chaînes des sels nutritifs qui nous sont utiles (Ammonium, nitrites, nitrates, phosphates et silicates).

Avant tout dosage, il est nécessaire de préparer une gamme d'étalonnage (contenant chaque sel) qui servira de référence pour le calcul des concentrations réelles des échantillons.

Les phosphates sont dosés par la méthode de Murphy et Riley (1962) qui reste aujourd'hui la plus rapide et la plus simple. Les ions phosphates réagissent avec le Molybdate d'ammonium $((\text{NH}_4)_6(\text{Mo}_7\text{O}_{24}))$, en présence d'antimoine (Sb_3), pour former un complexe que l'on réduit par l'acide ascorbique ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$). Cette forme réduite, de coloration bleue, possède un maximum d'absorption à 885 nm. Ce composé contient donc le phosphore, le molybdène et l'antimoine dans les proportions atomiques 1/12/1.

La méthode du dosage de **l'ammonium** est celle de Koroleff (1976). L'ammoniac forme une monochloramine avec l'hypochlorite en milieu basique; celle-ci réagit avec le phénol en présence d'un excès d'hypochlorite pour former le bleu d'indophénol absorbant à 630 nm.

La méthode décrite pour **les nitrites** est fondée sur la réaction de Griess, et appliquée à l'eau de mer par Bendscheider et Robinson (1952). Les ions nitrites forment un diazoïque avec la sulfanomide en milieu acide selon la réaction suivante:



Puis le diazoïque réagit avec le N-naphtyl-éthylèndiamine pour former un colorant rose (absorption à 543 nm) :



Quant à l'ion **nitrate**, il est la forme oxydée stable de l'azote en solution aqueuse et ne présente pas de facultés particulières de complexation et d'absorption. La méthode retenue est fondée

sur le dosage des ions nitrites obtenus après réduction des ions nitrates (>95%). On mesure donc en réalité la concentration des ions nitrites et nitrates. Par soustraction cependant, de la concentration en nitrite déterminée sans réduction, on obtient la concentration en nitrate. La réduction est obtenue après passage sur une colonne de cadmium traitée au cuivre avec des rendements importants.

Pour la **silice**, la solution est mélangée avec un acide de molybdate d'ammonium. Cette réaction produit l'acide silico-molybdique. L'acide ascorbique est ajouté afin de réduire ce dernier acide en un complexe silice-molybdène bleu (absorption à 660 nm). De l'acide oxalique est ajouté pour éviter les interférences avec les phosphates.

Enfin le SKALAR travaillant sur des concentrations très faibles (de l'ordre de la $\mu\text{mol/l}$), il est nécessaire d'insister sur le fait de manipuler extrêmement proprement et minutieusement tant pour la validité des résultats que pour le bon fonctionnement de l'appareil. Ainsi les échantillons une fois prélevés sont filtrés sur Watman GF/C de 47 mm, pour enlever toute matière en suspension (cellules en particulier). Ils sont ensuite congelés de façon à prévenir toute dégradation des sels nutritifs en attendant leur analyse au Skalar.

La mesure de la matière particulaire

La **matière en suspension** est mesurée par filtration sur filtre GF/C Whatman 47 mm au préalable brûlés et pesés avec une précision du 1/10 de milligramme. Après filtration les filtres sont séchés à 60°C et refroidis dans un dessiccateur. Leur masse est mesurée.

La **matière organique particulaire** est ensuite obtenue par le même procédé de pesée après une calcination de 4H à 450°C.

Le matériel de mesure des analyses physiques

Les appareils utilisés pour la mesure des paramètres physiques de l'eau sont adaptés au terrain: solidité, miniaturisation et autonomie énergétique.

Température, salinité : conductimètre WTW 190

Oxygène : oxymètre WTW ou YSI model 58

pH : pH-mètre Portamess 752 KNICK avec électrode combinée gélifiée Ingold

Centrales d'acquisition : LICOR Li-1000; elles permettent l'enregistrement en continu et simultanée de plusieurs paramètres sur plusieurs jours lorsqu'elles sont reliées à des sondes ou aux appareils décrits ci-dessus. Une fois relié à un micro-ordinateur, un logiciel transfère le fichier qui peut être lu par un tableur.

Annexe 2: Essai d'engraissement de l'huître alimentée en continu de la diatomée *Skeletonema costatum*.

Méthodologie

La biomasse produite par le module phytoplanctonique est estimée à $1,2 \cdot 10^{11}$ cellules de *Skeletonema costatum* par jour. Or, d'après Baud *et al.* (1995), la ration alimentaire théorique est proche de 10^9 cellules de cette diatomée par huître à affiner et par jour. Le module est donc capable d'alimenter 120 huîtres en continu. Un essai a été réalisé avec 80 huîtres (*Crassostrea gigas*) placées en sortie du module de production phytoplanctonique (figure 1), mais la consommation du phytoplancton était faible (20%), en raison des températures basses (8 à 10°C) et d'un renouvellement du bac à huîtres important (100% par jour).

Au 56^{ème} jour, il a été décidé de tripler la charge (240 huîtres) et de placer les huîtres dans un bac de 400 litres, et de renouvellement quotidien 60%. A partir du 65^{ème} jour, la température a brutalement chuté aux environs de 0°C, bloquant la filtration de l'huître. Ces conditions climatiques ont duré 15 jours et provoqué l'apparition d'une couche glace de 10 cm sur les bacs, ce qui a conduit à arrêter les essais.

L'indice de condition a été réalisé après 7 jours d'engraissement en comparaison avec des huîtres du même lot mais posées sur le fond en claire (figure 15). Deux indices ont été utilisés:

$$AFNOR = \left(\frac{m_t}{m_c} \right) \times 100$$

$$L\&S = \left(\frac{m_{cs}}{m_t - m_{co}} \right) \times 1000$$

m_t : poids total; m_c : poids de la chair humide; m_{co} : poids de la coquille; m_{cs} : poids de la chair sèche

L'indice AFNOR est issu de la norme française NF V45-056 et détermine les différentes dénominations d'huîtres: l'indice d'une huître fine doit être compris entre 6,5 et 9 et celle d'une huître spéciale supérieure à 9.

L'indice de condition scientifique Lawrence et Scott (1982) a été choisi pour sa bonne représentativité de l'état physiologique et de la croissance de *Crassostrea gigas* (Bodoy *et al.*, 1986).

Résultats

Consommation du phytoplancton

Du 56 au 63^{ème} jour, la densité cellulaire en entrée de bac était de $400 \cdot 10^3$ cellules par ml et en sortie de $20 \cdot 10^3$ cellules par ml : la consommation du phytoplancton a varié de 89 à 96 % ce qui représente une ration quotidienne par huître de $0,37 \cdot 10^9$ cellules, soit 3 fois moins que les données de Baud *et al.* (1995).

Indices de conditions

L'indice moyen AFNOR est élevé pour les deux lots d'huîtres, ce qui s'explique par une coquille légère comparée à la taille de l'individu (figure 15).

La moyenne des indices est supérieure pour les huîtres engraisées de 8,2% pour l'indice AFNOR et de 17,7% pour L&S. Cependant les deux lots ne sont pas significativement différents (écarts types trop importants).

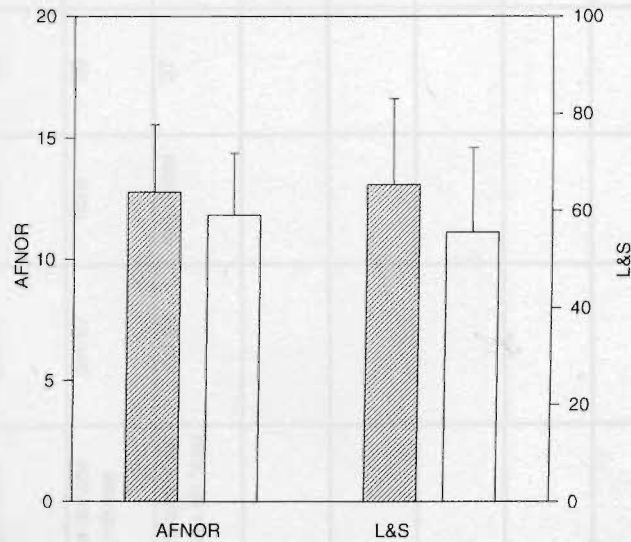


Figure 15: Evolution des indices de conditions AFNOR et Laurence & Scott des huîtres alimentées (▨) ou non (□) en *Skeletonema costatum*.

Discussion

La consommation presque complète (90 %) du phytoplancton montre que la charge en huître est trop élevée par rapport à la quantité de nourriture généralement admise pour un engraissement maximal. La densité optimale de mollusques, pour le module, doit se trouver proche de 120 huîtres ce qui représente une ration quotidienne d'environ 10^9 cellules par individu.

Bien que l'engraissement n'ait duré qu'une semaine, le gain de poids de chair est effectif. Il serait également préférable à l'avenir d'expérimenter sur des huîtres de plus faible indice de condition, pour constater un engraissement important.

Toutefois, dans l'optique du dimensionnement d'un filtre biologique à huîtres, devant arrêter le plus possible de microalgues (traitement par les microalgues d'effluents riches en nutriments), ce premier essai a permis d'approcher la biomasse en huîtres maximale à mettre en place pour fixer la majorité des cellules phytoplanctoniques traversant le "filtre à huîtres". Dans ce cas, un apport par huître de $0,4 \cdot 10^9$ cellules par jour de *Skeletonema costatum* paraît un maximum à ne pas dépasser.

RIDRV97

N° RI DRV	DEPARTEMENT	LABORATOIRE	AUTEURS	TITRE	DATE SORTIE	DIFFUSION	NB PAGES	TIRAGE
97/01	RA	Physiologie des Poissons	J.L. Gaignon, L. Quémener, A. Fauré, Y. Harache	Croissance et survie marines de post-smolts de saumons atlantiques (<i>Salmo salar</i>) : effets de leur origine, de l'alimentation, des structures et des techniques d'élevage.	fév-97	libre	44	50
97/02	RA	U.R.A.P.C. La Tremblade	P. Gouletquer	A Bibliography of the Manila Clam <i>Tapes philippinarum</i>	mar-97	libre	120	100
97/3	RA	Martinique	B. Noguerra	Elements de biologie et données d'élevage de la dorade coryphène (<i>Coryphaena hippurus</i> , L.1758) : synthèse bibliographique	avr-97	libre	30	50
97/4	RA	CREMA L'Houmeau	N. Brossard, J. Hussenot	Maîtrise de la culture de masse de la diatomée <i>Skeletonema costatum</i> en système ouvert et continu sur un milieu en "eau de mer enrichie"	avr-97	restreinte	37	60